

LUCIANA DE SOUZA NEVES

FERMENTADO PROBIÓTICO DE SUCO DE MAÇÃ

Tese apresentada como requisito à obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos Agroindustriais, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador:

Prof. Dr. Gilvan Wosiacki

Co-orientadora:

Profª Dra. Adenise Lorenzi Woiciechowski

CURITIBA

2005

LUCIANA DE SOUZA NEVES

FERMENTADO PROBIÓTICO DE SUCO DE MAÇÃ

Orientador:

Prof. Dr. Gilvan Wosiacki

Co-orientadora:

Profª Dra. Adenise Lorenzi Woiciechowski

CURITIBA

2005

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE QUADROS.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 AGROINDÚSTRIA DA MAÇÃ.....	2
2.2 SUCO DE MAÇÃ	3
2.3 ALIMENTOS FUNCIONAIS	6
2.3.1 A Maçã e o Suco de Maçã como Alimentos Funcionais	8
2.3.2 Probióticos	10
2.3.2.1 Bactérias lácticas.....	16
2.3.2.2 Produtos e pesquisas com probióticos	25
2.4 ANÁLISE SENSORIAL	28
3 OBJETIVOS.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 MATERIAL.....	31
4.2 MÉTODOS.....	31
4.2.1 Preparo do Suco de Maçã	31
4.2.2 Preparo do Inóculo	31
4.2.3 Acompanhamento do Crescimento Celular	32
4.2.4 Tratamentos dos Meios para o Acompanhamento do Crescimento Celular ...	32
4.2.4.1 Acompanhamento do crescimento celular em banho termostatizado ..	32
4.2.5 Análises para o Acompanhamento do Crescimento Celular.....	33
4.2.5.1 Microbiológicas	33
4.2.5.2 Físico-químicas.....	33
4.2.5.3 Estatísticas.....	34
4.2.6 Acompanhamento da Viabilidade Celular	34
4.2.7 Análises Para o Acompanhamento da Viabilidade Celular por 28 Dias.....	34
4.2.7.1 Microbiológicas	34
4.2.7.2 Físico-químicas.....	35

4.2.8	Delineamento Experimental do Estudo da Otimização do Crescimento Celular de <i>Lactobacillus casei</i> em Suco de Maçã Gala e Fuji.....	35
4.2.9	Análise Sensorial Descritiva Quantitativa	35
4.2.9.1	Pré-seleção de provadores.....	36
4.2.9.2	Levantamento de terminologia descritiva.....	37
4.2.9.3	Treinamento dos provadores	39
4.2.9.4	Seleção final	40
4.2.9.5	Avaliação das amostras.....	40
4.2.10	Análise Sensorial de Aceitação	41
4.2.10.1	Formulações.....	41
4.2.10.2	Análises.....	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA.....	43
5.2	CRESCIMENTO CELULAR DE <i>Lactobacillus casei</i> E <i>Lactobacillus acidophilus</i>	47
5.3	VIABILIDADE CELULAR DE <i>Lactobacillus casei</i> EM SUCO DE MAÇÃ FERMENTADO.....	60
5.4	ESTUDOS COMPLEMENTARES DO CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus casei</i>	63
5.4.1	Crescimento de <i>Lactobacillus casei</i> em Suco de Maçã, Variedade Sansa.....	63
5.4.2	Acompanhamento do Crescimento de <i>Lactobacillus casei</i> em Banho Termostático sob Agitação	65
5.5	ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA	69
5.6	ANÁLISE SENSORIAL DE ACEITAÇÃO.....	80
6	CONCLUSÕES.....	82
7	REFERÊNCIAS	84
	APÊNDICE.....	90

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Fluxograma do processamento em laboratório de suco de maçã clarificado	4
FIGURA 2 – Modelo de ficha utilizada no teste de gostos básicos para a pré-seleção de provadores	36
FIGURA 3 – Modelo de ficha utilizada no teste de reconhecimento de odores básicos para a pré-seleção de provadores.	37
FIGURA 4 – Modelo de ficha utilizada para o levantamento da terminologia descritiva	38
FIGURA 5 – Modelo de ficha utilizada para seleção final e avaliação das amostras	39
FIGURA 6 – Modelo de ficha utilizada para análise sensorial de aceitação, para avaliação das diferentes formulações do produto final	42
FIGURA 7 – Evolução do pH em suco de maçã das variedades Fuji e Gala, durante a fermentação láctica com <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Lactobacillus casei</i>	48
FIGURA 8 – Evolução da acidez em suco de maçã das variedades Fuji e Gala, durante a fermentação láctica com <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Lactobacillus casei</i>	49
FIGURA 9 – Evolução da acidez em suco de maçã das variedades Fuji e Gala, durante a fermentação láctica com <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Lactobacillus casei</i> com pH modificado para 5,5	50
FIGURA 10 – Evolução do pH em suco de maçã das variedades Fuji e Gala, durante a fermentação láctica com <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Lactobacillus casei</i> em pH modificado para 5,5.....	51
FIGURA 11 – Evolução de UFC/mL de células de <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> , em suco de maçã das variedades Fuji e Gala com pH original, durante a fermentação láctica	53
FIGURA 12 – Evolução de UFC/mL de células de <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> , em suco de maçã das variedades Fuji e Gala com pH 5,5, durante a fermentação láctica.....	53
FIGURA 13 – Evolução do consumo de açúcares redutores por <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> , em suco de maçã das variedades Fuji e Gala durante a fermentação láctica	56

FIGURA 14 – Evolução do consumo de açúcares redutores por <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> , em suco de maçã das variedades Fuji e Gala com pH 5,5, durante a fermentação láctica.....	56
FIGURA 15 – Efeito do pH no crescimento de <i>Lactobacillus casei</i> em suco de maçã Gala em 20 horas de incubação	59
FIGURA 16 – Efeito do pH no crescimento de <i>Lactobacillus casei</i> em suco de maçã Fuji em 20 horas de incubação	59
FIGURA 17 – Monitoramento da evolução do pH e da acidez titulável em suco de maçã Gala, fermentado com <i>Lactobacillus casei</i> sob armazenamento refrigerado por 28 dias	60
FIGURA 18 – Evolução do Log de UFC/mL de <i>Lactobacillus casei</i> em suco de maçã Sansa, durante a fermentação láctica.....	63
FIGURA 19 – Evolução da acidez titulável em suco de maçã da variedade Sansa, durante a fermentação láctica.....	63
FIGURA 20 – Evolução do pH em suco de maçã da variedade Sansa, durante a fermentação láctica.....	64
FIGURA 21 – Evolução do pH em suco de maçã gala com diferentes inóculos, durante a fermentação láctica.....	65
FIGURA 22 – Representação gráfica dos resultados de ADQ da média dos atributos cor caramelo, aroma maçã, gosto ácido, maçã e doce e textura encorpada.	76
FIGURA 23 – Análise de componentes principais (ACP) de suco de maçã puro e probiótico	77
FIGURA 24 –intensidade dos atributos sensoriais.....	78
FIGURA 25 – Porcentagem de aceitação das formulações F1, F2 e F3.....	81

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Atividade antioxidante e concentração de compostos fenólicos de cultivares de maçã produzidas em Nova York	9
TABELA 2 - Benefícios nutricionais de alimentos funcionais, com bactérias probióticas, para a saúde	12
TABELA 3 – Habitats dos <i>Lactobacillus casei</i>	15
TABELA 4 - Alimentos e bebidas fermentados e sua associação às bactérias lácticas	17
TABELA 5 – Lista de espécies do gênero <i>Lactobacillus</i>	18
TABELA 6 – Funções e aplicações de <i>Lactobacillus</i> sp. geneticamente modificados	19
TABELA 7 – Produtos comerciais contendo espécies de Bifidobactérias e Lactobacilos	27
Tabela 8 - Delineamento experimental do estudo da otimização do crescimento celular de <i>Lactobacillus casei</i> em suco de maçã Gala e Fuji	35
TABELA 9 – Características físico-químicas dos sucos de maçã das variedades Gala, Fuji e Sansa.....	43
TABELA 10 – Características físico-químicas de suco de maçã da variedade Gala produzida em Santa Catarina.....	44
TABELA 11 - Características físico-químicas de suco de maçã da variedade Gala produzida na safra 2001-2002	44
TABELA 12 – Características físico-químicas dos inóculos de <i>Lactobacillus casei</i> em leite desnatado reconstituído (LDR 10%), suco de maçã Gala e caldo MRS	45
TABELA 13 - Médias das análises físico-químicas dos tratamentos com pH original	47
TABELA 14 - Médias das análises físico-químicas dos tratamentos com sucos com pH 5,5.....	49
TABELA 15 – Concentração de ácido málico e láctico em suco de maçã Gala, inoculado com <i>Lactobacillus casei</i> em LDR 10%, fermentado por 20 horas	52

TABELA 16 – Log de UFC/mL de <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Lactobacillus casei</i> na fermentação de 20 horas do suco de maçã	54
TABELA 17 – Variação da transmitância em função do crescimento celular (620 nm), dos tratamentos em suco de maçãs das variedades Fuji e Gala com pH original, durante a fermentação láctica	54
TABELA 18 – Variação da transmitância em função do crescimento celular (620 nm), em suco fermentado de maçãs das variedades Fuji e Gala com pH do meio ajustado em 5,5, durante a fermentação láctica.....	55
TABELA 19 – Delineamento estatístico do pH e do crescimento de <i>Lactobacillus casei</i> em suco de maçã Gala utilizado na figura 15	58
TABELA 20 – Delineamento estatístico do pH e do crescimento de <i>Lactobacillus casei</i> em suco de maçã Fuji utilizado na figura 16.....	58
TABELA 21 – Concentração de células viáveis de <i>Lactobacillus casei</i> em suco de maçã Gala por 28 dias à 8°C	61
TABELA 22 – Parâmetros microbiológicos e físico-químicos em suco de maçã Gala com diferentes inóculos, durante a fermentação láctica	65
TABELA 23 – Parâmetros microbiológicos e físico-químicos do suco de maçã gala fermentado com inóculo de LDR 10% e pH 4,0 constante.....	69
TABELA 24 – Análise de variância para o atributo da aparência, cor caramelo, de amostras de suco de maçã fermentado com <i>Lactobacillus casei</i>	72
TABELA 25 – Análise de variância para o atributo aroma maçã de amostras de suco de maçã fermentado com <i>Lactobacillus casei</i>	72
TABELA 26 – Análise de variância para o sabor ácido de amostras de suco de maçã fermentado com <i>Lactobacillus casei</i>	72
TABELA 27 – Análise de variância para o sabor maçã de amostras de suco de maçã fermentado com <i>Lactobacillus casei</i>	73
TABELA 28 – Análise de variância para o atributo gosto doce de amostras de suco de maçã fermentado com <i>Lactobacillus casei</i>	73
TABELA 29 – Análise de variância para o atributo textura encorpada de amostras de suco de maçã fermentado com <i>Lactobacillus casei</i>	73
TABELA 30 – Análise de variância para o atributo da aparência, cor caramelo, de amostras de suco de maçã fermentado com <i>Lactobacillus casei</i>	74

TABELA 31 – Análise de variância para o atributo aroma maçã de amostras de suco de maçã fermentado com <i>Lactobacillus casei</i>	74
TABELA 32 – Análise de variância para o gosto de maçã de amostras de suco de maçã fermentado com <i>Lactobacillus casei</i>	74
TABELA 33 – Análise de variância para o gosto ácido de amostras de suco de maçã fermentado com <i>Lactobacillus casei</i>	75
TABELA 34 – Análise de variância para o atributo gosto doce de amostras de suco de maçã fermentado com <i>Lactobacillus casei</i>	75
TABELA 35 – Análise de variância para o atributo textura encorpada de amostras de suco de maçã fermentado com <i>Lactobacillus casei</i>	76
TABELA 36 – Média dos atributos sensoriais das três amostras de suco de maçã avaliadas, conforme determinado pela equipe sensorial no teste de ADQ.	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação dos atributos sensoriais obtidos das fichas de todos os provadores, com a indicação do número de vezes (N) em que cada atributo foi citado.....	70
Quadro 2 – Definições e referências para os atributos da ADQ.....	70
Quadro 3 – Níveis de significância para provadores em função de discriminação das amostras ($F_{amostra}$).....	71
Quadro 4 – Níveis de significância para provadores em função de discriminação das repetições ($F_{repetição}$).....	71
Quadro 5 – Frequência e proporções dos provadores em relação às formulações e graus de apreciação do fermentado de suco de maçã.....	80

RESUMO

A cultura da maçã no Brasil iniciou nos anos 70 e desde então apresentou aumento significativo. O processo de seleção do fruto é rigoroso e resulta num descarte de até 30% da produção. Cerca de 2/3 destas frutas são sadias e podem ser aproveitadas para a elaboração de suco, sidra, pectina, geléia, entre outros produtos. A maçã é reconhecida como promotora de benefícios à saúde devido ao seu conteúdo de compostos bioativos, como polifenóis, pectinas e ácidos, podendo ser classificada como alimento funcional. Dentro desta classificação são encontrados também os alimentos probióticos, que contêm microrganismos vivos benéficos e específicos. Desta forma, foi proposto associar a funcionalidade do suco de maçã às características probióticas destas bactérias. O objetivo geral do trabalho foi desenvolver um fermentado probiótico de suco de maçã com *Lactobacillus* onde os objetivos específicos foram avaliar o crescimento de *Lactobacillus casei* (Lcc) e de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) em suco clarificado de maçã, das variedades Gala e Fuji; avaliar a viabilidade do Lcc em suco de maçã Gala, armazenado por 28 dias sob refrigeração; avaliar o crescimento de Lcc em suco de maçã Sansa; caracterizar sensorialmente o suco de maçã Gala e, o mesmo, após fermentação com Lcc, nos tempos 0 e 30 dias de armazenamento refrigerado; e verificar a aceitabilidade de três formulações do fermentado probiótico. O processo fermentativo a 37°C foi monitorado por 20 horas pela acidez total, pH, açúcares redutores, biomassa e contagem de colônias tanto por UFC/mL quanto por espectrometria. O monitoramento da viabilidade celular foi feito pela contagem de UFC/mL, acidez titulável e pH. Para a caracterização sensorial foi utilizado o método da análise descritiva quantitativa (ADQ) e a aceitabilidade do produto testada com 3 formulações, [1] suco fermentado, [2] adicionado de sacarose 2% e [3] adicionado de amido modificado 1%. O Lcc apresentou maior número de UFC/mL no suco de maçã Gala que o La-5. O número de células viáveis, no produto fermentado, é suficiente para indicar o fermentado de suco de maçã como alimento probiótico. Não há necessidade de modificação do pH original dos sucos. O tempo ideal de crescimento para o Lcc, para a produção do fermentado probiótico, tanto em suco Fuji como Gala e Sansa é de 10 horas. O produto fermentado com Lcc em maçã Gala, conservado sob refrigeração, tem viabilidade probiótica de 28 dias. Sensorialmente o suco puro de maçã Gala é caracterizado por cor caramelo, aroma e gosto de maçã; o fermentado probiótico de suco de maçã Gala com Lcc, com tempo de armazenamento de zero dias, é caracterizado por textura encorpada e gosto doce. E o fermentado probiótico, com tempo de armazenamento de 30 dias a 8°C, é caracterizado por textura encorpada e gosto ácido. O produto final do processo de fermentação da maçã Gala, com Lcc, por 10 horas, não necessita de modificações físico-químicas para ser aceito sensorialmente. O fermentado probiótico com Lcc em suco de maçã Gala é viável, pode ser armazenado sob refrigeração por 28 dias e tem aceitação sensorial de 96%.

Palavras-chave: Fuji, Gala, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, ADQ, análise sensorial de aceitação.

ABSTRACT

The cultivation of apples in Brazil began in the 1970s and has shown a significant increase since then. The fruit selection process is rigorous and results in a discard of 30% of the production, but 2/3 of this discard are healthy fruit that can be used in the production of juice, cider, pectin, jelly, and other products. Apples are known to promote health benefits because of their bioactive compounds as polyphenols, pectin and acids, and can thus be classified as functional food. This classification also includes the probiotic foods, which contain specific live microorganisms. Thus the idea arose to associate the functionality of apple juice and the probiotic characteristics of bacteria. The main purpose of this study was to develop a fermented probiotic of apple juice with *Lactobacillus*. In order to accomplish this it was necessary to evaluate the growth of *Lactobacillus casei* (Lcc) and *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in clarified juice of the Gala and Fuji varieties. It was also necessary to evaluate the viability of Lcc in Gala apple juice stored for twenty-eight days under refrigeration; to evaluate the growth of Lcc in Sansa apple juice; to characterize the sensorial profile of Gala apple juice before and after fermentation with Lcc at zero and thirty days of refrigerated storage; and finally, to verify the acceptability of the three formulae of fermented probiotics. The fermentation processes at 37°C was monitored for twenty hours in order to verify titrable acidity, pH, reducing sugars, biomass, amount of viable colonies (FCU/mL), and spectrometry. The monitoring of the cell viability was accomplished by means of counting the FCU/mL, the titrable acidity and the pH. In order to characterize sensorial properties the quantitative descriptive analysis (QDA) was used, and the acceptability of product was tested with three formulae, [1] fermented juice, [2] fermented juice with the addition of 2% sucrose and [3] fermented juice with the addition of 1% modified starch. The fermented juice presented a higher number of cells in the fermented product is enough to indicate it as a probiotic food. It is not necessary to modify the pH of the juice. The ideal time for the Lcc growth for the production of the fermented probiotic with Fuji, Gala and Sansa juice is ten hours. The fermented Gala apple juice with Lcc, stored at 8°C, has a probiotic viability of twenty-eight days. Sensorially, Gala apple juice is characterized by its caramel color and its apple aroma and taste. The fermented juice, at zero storage time, is characterized by a dense texture and an a sweet taste attributes and, in 30 days of storage, by acid taste and a dense texture. The final product of ten-hour fermentation process of Gala apple juice fermentation process with Lcc does not need physicochemical modifications in order to be sensorially acceptable. Thus, the probiotic fermented Gala juice is viable, can be stored under refrigeration for twenty-eight days and has sensorial acceptance of 96%.

Key-words: Fuji, Gala, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, DQA, acceptance sensorial analysis.

1 INTRODUÇÃO

A produção da maçã no Brasil tem como finalidade atender a demanda do uso da fruta para consumo *in natura*. O processo de seleção empregado, rigoroso em função da exigência do mercado, gera um descarte que pode alcançar até 30% da produção. Estas maçãs de descarte são consideradas industriais e cerca de 2/3 são frutas absolutamente sadias, apresentando problemas com a aparência, mas podendo ser aproveitadas para a elaboração de suco, sidra, pectina, geléia, entre outros produtos.

A maçã é reconhecidamente importante para a saúde humana devido ao seu conteúdo de compostos bioativos, promotores de benefícios para o consumidor habitual. Dentre os compostos bioativos da maçã encontram-se os polifenóis com função antioxidante, as pectinas e ácidos que promovem o equilíbrio do trânsito gastrointestinal. Durante o processamento do suco de maçã, estes compostos bioativos são extraídos.

Desta forma, a maçã e seu suco podem ser considerados alimentos com apelo funcional, ou seja, alimentos que promovem a manutenção da saúde mediante seus compostos e/ou microrganismos bioativos naturalmente presentes ou adicionados, como fibras, oligossacarídeos, antioxidantes e microrganismos probióticos. Dentre os microrganismos probióticos utilizados para o desenvolvimento de novos produtos estão o *Lactobacillus acidophilus* e o *Lactobacillus casei*, pois são de reconhecida efetividade e referenciados em inúmeras pesquisas científicas.

Os alimentos probióticos existentes no mercado brasileiro são de origem láctea. Com a intenção de diversificar os produtos probióticos e os da agroindústria da maçã, pesquisas no sentido de associar a funcionalidade do suco de maçã às características probióticas das bactérias parecem promissoras.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão aborda assuntos pertinentes ao desenvolvimento do fermentado probiótico de suco de maçã. É ressaltada a sua importância para a agroindústria e para o consumidor, descrevendo a elaboração do suco clarificado de maçã, as definições, características e importância dos alimentos funcionais, probióticos e o porquê de o suco de maçã ser enquadrado nesta classificação de alimento funcional.

Também são apresentadas as características dos microrganismos probióticos, especificamente das bactérias lácticas do gênero lactobacilos e seu metabolismo de fermentação láctica e maloláctica, as pesquisas e produtos probióticos existentes na literatura também são citados e, por último, a análise sensorial no contexto do desenvolvimento de novos produtos.

2.1 AGROINDÚSTRIA DA MAÇÃ

A cultura da maçã no Brasil teve seu início nos anos 70 e neste século apresenta quantidade expressiva de matéria-prima agroindustrial (ABPM, 2004). Há a necessidade de pesquisas no sentido de diversificar a utilização da matéria-prima e, considerando também o *status* dos alimentos funcionais em termos mundiais, uma associação de probióticos com o suco de maçã apresenta-se como uma excelente opção.

Segundo Janzantti, Franco e Wosiacki (2003) no ano de 1995 foram processadas 48.000 toneladas de maçãs, cerca de 10% da produção bruta e, a produção brasileira em 2000 alcançou mais de 900.000 toneladas sendo que as maiores produções foram observadas nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, onde se verifica um crescimento significativo desta agroindústria (ABPM, 2004).

A safra de 2003/2004 totalizou o abastecimento do mercado interno com 525.000 toneladas de frutas comerciais, 75.000 toneladas destinadas à exportação e o descarte foi de aproximadamente 150.000 toneladas (NOGUEIRA, 2003). Janzantti, Franco e Wosiacki (2003) citam, fundamentados nas informações

divulgadas na mídia pela Associação Brasileira dos Produtores de Maçã (2003), que as variedades mais cultivadas são a Gala (46%), a Fuji (45%) e a Golden (6%).

As maçãs que não servem para uso *in natura* são consideradas matérias-primas industriais, de baixo custo e seu aproveitamento pode agregar valor ao fruto e gerar lucro às indústrias. Esta matéria-prima pode ser direcionada para a produção de suco, sidra (NOGUEIRA, 2003), produção de vinagre e, do bagaço resultante do processo, pode ser extraída a pectina (SCHEMIN, 2003) e produtos especiais como fermentado, de baixo teor alcoólico (SILVA, 2004).

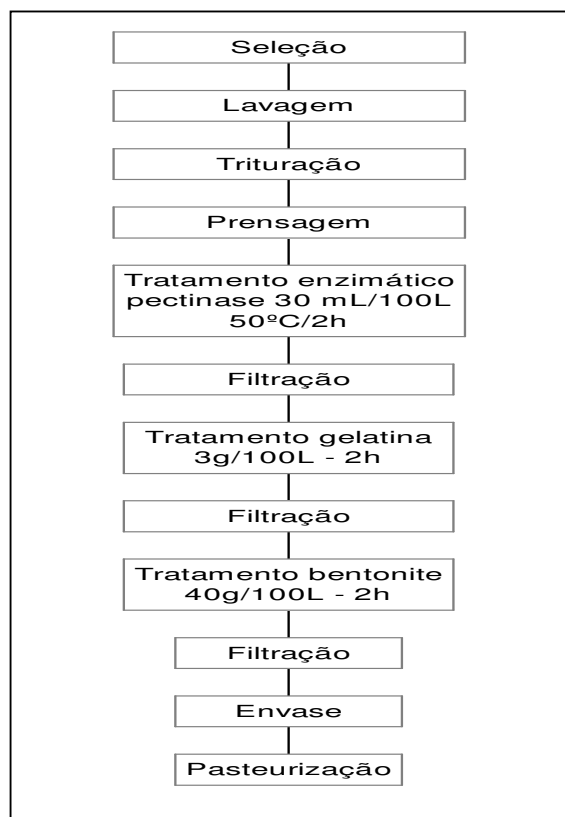
2.2 SUCO DE MAÇÃ

O suco de maçã, obtido pela fragmentação e prensagem de frutas sadias, maduras e frescas, não alcoólico e não fermentado, recebe tratamentos para a sua estabilização, clarificação e polimento assim como aditivos permitidos pela legislação (VARNAM e SUTHERLAND, 1999; AQUARONE et al., 2001). O seu sabor, resultante da interação do gosto e do aroma, apresenta interferências de fatores ambientais, como clima, temperatura, excesso ou escassez de chuvas, composição do solo, variedade e grau de maturação da matéria-prima assim como pelas etapas do processamento que interferem no perfil sensorial quando comparado à fruta fresca (MERORY¹ *apud* JANZANTTI, FRANCO e WOSIACKI, 2003).

As etapas de processamento do suco clarificado de maçã compreendem a seleção, lavagem, cominuição, prensagem, despectinização, filtração I, clarificação com gelatina, filtração II, clarificação com bentonite, filtração III, engarrafamento e tratamento térmico para estabilização (WOSIACKI, PHOLMAN e NOGUEIRA, 2004 – FIGURA 1).

¹ MERORY, J. **Food Flavorings**. Connecticut: The Avi Publishing Company, Inc. p. 3-59, 1968.

FIGURA 1- FLUXOGRAMA DO PROCESSAMENTO EM LABORATÓRIO DE SUCO DE MAÇÃ CLARIFICADO



A qualidade do suco também depende da tecnologia empregada e das características da fruta. Embora a matéria-prima seja considerada como um subproduto do comércio da fruta maçã, para ser utilizada deve ser sadia, ou seja, livre de microorganismos e de fermentações. Por isso, no início do processamento os frutos devem ser lavados para serem retiradas as sujidades do campo e, em seguida, as partes impróprias, tanto para consumo quanto para industrialização, devem ser expurgadas (WOSIACKI, PHOLMAN e NOGUEIRA, 2004).

O uso de moinhos de facas promove a fragmentação da matéria-prima, reduzindo o tamanho com pouca perda da integridade tissular da fruta, mantendo a estrutura que facilita a prensagem e extração do suco. Este suco, rapidamente escurecido em função da presença de enzimas oxidativas, de polifenóis e de oxigênio, apresenta-se com um aspecto desagradável, pois o material polimerizado rapidamente adere às substâncias pécticas revelando a sua presença. Por isto torna-se necessário despectinizá-lo e clarificá-lo, para torná-lo mais atraente ao consumidor (MADRID, CENZANO e VICENTE, 1996). Tecnicamente, estes dois

processos visam a obtenção de um produto límpido, de boas características de aceitação, e estabilidade (VARNAM e SUTHERLAND, 1999).

As substâncias pécticas são compostas de unidades de ácido galacturônico, unidos por ligações glicosídicas α (1→4). As moléculas de pectina apresentam-se em estado coloidal e são hidrofílicas devido ao grande número de grupos polares em sua estrutura; além disso, contém grupos carboxílicos, metoxilados ou não, que lhes confere uma característica ácida, sendo capazes de formar sais (AQUARONE et al., 2001).

O uso de enzimas na tecnologia de sucos, como as pectinases, teve início por volta de 1930 e desde então a demanda por estas enzimas tem sido crescente. Podem ser divididas em dois grupos, as despolimerizantes e as saponificantes (AQUARONE et al., 2001). A pectina metil esterase (PME), desmetoxila a pectina resultando na liberação dos grupos de ácido galacturônico negativamente carregados. Desta forma, são combinados fortemente com complexos de cátions, como o Ca^{2+} , para formar flocos sedimentantes ou, alternativamente, combinar fracamente com complexos de cátions para formar flocos hidratados estáveis. A pectina nesta forma une-se a proteínas, assim, torna-se necessário à adição da poligalacturonase (PG). Tal enzima quebra as longas cadeias, reduzindo a viscosidade. Esta quebra de cadeias altera os complexos proteína-pectina causando agregação em largas partículas as quais sedimentam, melhorando a propriedade filtrante do suco (VARNAM e SUTHERLAND, 1999).

As etapas de clarificação ou polimento, podem ser feitas com o uso de gelatina e/ou bentonite tornando o produto límpido e brilhante. No processo são removidas por adsorção, substâncias de cargas positivas e negativas como proteínas e compostos fenólicos (AQUARONE et al., 2001).

A bentonite ou montmorilonite, uma argila que resulta da alteração de cinzas ou tufos vulcânicos ácidos, de granulometria fina, tem capacidade de aumentar de volume em meio aquoso, tendo cores variadas (branco, verde, azul, rosa ou creme) e baixa refratibilidade. Pode ser utilizada antes e/ou após a aplicação da gelatina (AQUARONE et al., 2001; VARNAM e SUTHERLAND, 1999).

A gelatina é uma mistura de polipeptídeos obtida por tratamento ácido ou alcalino do colágeno, derivada do tecido conectivo de animais. A proteína encontra-se com carga positiva, devido ao valor de pH do suco de maçã, por isso, forma

flocos insolúveis com fragmentos carregados negativamente que podem ser removidos por decantação, centrifugação ou filtração (VARNAM e SUTHERLAND, 1999; MADRID, CENZANO e VICENTE, 1996).

Caso estes dois processos, despectinização e clarificação, não sejam realizados adequadamente ocorre turvação e sedimentação durante o armazenamento, o que desvaloriza o produto (WOSIACKI et al., 1989).

Em algumas fábricas o suco é filtrado sem o tratamento prévio com enzimas e, para isso, o método utilizado é o de retirar as partículas grossas através de peneiras, com resfriamento por trocadores de calor e armazenamento durante período suficiente para que ocorra a sedimentação. Porém, o mais comum é a aplicação de enzimas como a pectinase, para facilitar o processo de filtração, evitando o entupimento do filtro por colóides da maçã, resultando num suco de aparência límpida (AQUARONE et al., 2001).

Para finalizar o processamento, os sucos passam por tratamento térmico para estabilidade microbiológica durante o armazenamento (WOSIACKI et al., 1989).

2.3 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Os consumidores estão cada vez mais atentos à relação alimento/saúde em consequência do *marketing* dos produtos alimentícios com propriedades promotoras à saúde, ou seja, dos alimentos funcionais (NUTRITION BUSINESS JOURNAL² *apud* LEROY e DE VUYST, 2004). A preferência por alimentos frescos, seguros, saborosos, com teores reduzidos de açúcar, gordura, sal e aditivos e de fácil preparo, têm mostrado demanda consideravelmente crescente nos últimos anos (LEROY e DE VUYST, 2004).

O mercado mundial dos alimentos funcionais gera 30 bilhões de dólares e tem crescimento de 5% ao ano. Estes alimentos contêm naturalmente ou são elaborados com compostos bioativos como fibras, oligossacarídeos, microrganismos para o equilíbrio da flora intestinal, proporcionando a manutenção da saúde corporal (ANDLAUER e FÜRST, 2002; SHAH, 2001).

² Nutrition Business Journal. **Functional foods report**. Penton Media, 2002.

É preciso definir a diferença entre os termos nutracêutico e alimento funcional, a denominação nutracêutico refere-se aos compostos bioativos enquanto que alimentos funcionais referem-se àqueles que possuem estes compostos bioativos e assim proporcionam benefícios à saúde (ANDLAUER e FÜRST, 2002).

A palavra nutracêutico foi proposta em 1989 pela *Foundation for Innovation in Medicine* (Nova York, EUA), para definir uma das áreas biomédicas de rápido crescimento. Estes compostos interferem na ação fisiológica específica contribuindo para a saúde do consumidor. Compreendem ácidos graxos poliinsaturados, mais conhecidos como óleos de peixe, fibras, proteínas, peptídeos, minerais, antioxidantes e amino ácidos como a arginina, e seu apelo nutricional é referente à proteção efetiva no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e inflamatórias e melhoramento do sistema imunológico (ANDLAUER e FÜRST, 2002).

Os alimentos funcionais, além de compreenderem àqueles que contém naturalmente compostos bioativos, também são representados pelos alimentos denominados probióticos, prebióticos e simbióticos (LEROY e DE VUYST, 2004; KNORR, 1998).

Os alimentos probióticos contêm microrganismos com capacidade de produzir substâncias antimicrobianas, compostos aromáticos, nutracêuticos, apresentam atividade enzimática e propriedades promotoras da saúde (LEROY e DE VUYST, 2004).

Os prebióticos são ingredientes alimentares não-digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro pelo estímulo seletivo do crescimento e/ou da atividade de uma ou um número limitado de bactérias no cólon, com potencial de manutenção da flora intestinal (GIBSON e ROBERFROID³ *apud* KNORR, 1998).

Os alimentos simbióticos incluem, em um mesmo produto, tanto compostos prebióticos quanto os microrganismos probióticos (KNORR, 1998).

³ GIBSON, G. R. e ROBERFROID, M. B.. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal Nutrition**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

Na prática médica, os compostos nutracêuticos e os alimentos funcionais, têm sido utilizados como auxiliares para a manutenção da saúde pela reposição da flora intestinal, promovendo a qualidade de vida dos pacientes (ANDLAUER e FÜRST, 2002). Exemplo disso é o consumo diário, pela população japonesa, de *Lactobacillus* como suplemento dietético, são administrados em pequenos volumes com propósitos medicinais (ITSARANUWAT, AL-HADDAD e ROBINSON, 2003).

2.3.1 A Maçã e o Suco de Maçã como Alimentos Funcionais

A maçã tem valor reconhecido para a saúde humana devido ao seu conteúdo de compostos bioativos, promotores de benefícios para a saúde do consumidor habitual. Dentre os compostos bioativos da maçã encontram-se os polifenóis com função antioxidante, as pectinas e ácidos que promovem o equilíbrio do trânsito gastrointestinal. Após o processamento da maçã para a obtenção de suco clarificado, os principais compostos funcionais que permanecem são polifenóis e ácidos (NOGUEIRA et al., 2003).

Compostos fenólicos

Os polifenóis da maçã fazem parte do grupo dos fitoquímicos, e são encontrados nas frutas, vegetais e cereais. Previnem ou reduzem o risco de algumas doenças crônicas como câncer e doenças cardiovasculares, agem pela retirada de radicais livres, de oxigênio livre e de radicais peróxidos. Inibem a lipoxigenase e o ciclo-oxigenase (RICE-EVANS, MILLER, e PAGANGA, 1996) tanto quanto a peroxidação de lipídios e, às vezes, desencadeia funções imunológicas e anti-inflamatórias na célula (DECHARNEUX et al., 1992).

A composição e a concentração de compostos fenólicos são dependentes da variedade da maçã, do grau de maturação e das condições de cultivo (LEA e ARNOLD, 1978) e sua participação nos alimentos funcionais reside na ação antioxidante (LEE e SMITH, 2000).

Evidências científicas indicam que compostos de ocorrência natural como componentes químicos não nutritivos, comumente referidos como fitoquímicos,

nutracêuticos, ou componentes funcionais, possuem essa atividade antioxidante, como os polifenóis (LEE e SMITH, 2000).

A diversidade dos polifenóis da maçã é distribuída nas classes de glicosídeos flavonóis, ácidos fenólicos, catequinas, dihidroalconas, e procianidinas. Na tabela 1 é possível verificar a atividade antioxidante de diferentes variedades de maçã (LEE e SMITH, 2000).

TABELA 1 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE CULTIVARES DE MAÇÃ PRODUZIDAS EM NOVA YORK

Variedade	Atividade antioxidante* %	Fenólicos totais (mg/100g)
Fuji	98.3	101.9
Spartan	81.5	83.6
Pioneer McIntosh	76.0	106.7
Delicious	75.7	123.8
Liberty	72.5	101.0
Granny Smith	72.1	134.5
Gala	47.7	85.2
Golden Delicious	<10	82.2

* Atividade antioxidante de 66 mg de maçã relativo a 30 ppm de α -tocoferol.

FONTE: LEE e SMITH (2000)

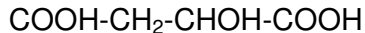
Os radicais livres, compostos formados durante a respiração, provocam a oxidação celular, o que diminui a atividade vital do organismo. Estes radicais podem ser eliminados por substâncias ou compostos antioxidantes que quelam ou estabilizam estes radicais, prevenindo a oxidação (LEE e SMITH, 2000).

As maiores fontes de antioxidantes citam-se nos chás (61%), as cebolas (13%) e as maçãs (10%) (HERTOG et al., 1993).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que o consumo regular de maçãs e outros produtos que contenham antioxidantes podem reduzir o risco de doenças crônicas, cardiovasculares, alguns tipos de câncer, em particular o da próstata, do fígado e do cólon (HERTOG et al., 1993; TSAO et al., 2003).

Ácidos

Dentre os ácidos orgânicos, málico, chímico e ácidos citromálicos (ARTHEY e ASHURTS, 2001), encontrados na maçã, o ácido málico é o que se apresenta em maior quantidade, entre 0,10 e 1,36%. Sua estrutura química é composta por carbonos, hidrogênios e oxigênios na seguinte disposição (AQUARONE et al., 2001):



O ácido málico é transformado a ácido láctico e gás carbônico por bactérias lácticas dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. Esta fermentação é denominada malolática e é caracterizada por diminuir a acidez do meio (GUMP e PRUETT, 1993). No item 2.3.2.1B o ácido málico e a fermentação malolática serão abordados com maiores detalhes.

Durante o processamento do suco clarificado ocorrem variações na composição e na concentração dos compostos bioativos da fruta, pois a pectina é degradada e retirada na etapa de despectinização, tal como parte dos fenóis que são retidos quando filtrados após o tratamento com bentonite (AQUARONE et al., 2001). Segundo Nogueira et al. (2003), a porcentagem de perda dos compostos fenólicos no processamento de suco clarificado em laboratório é de 66% e de 60% para Fuji e Gala, respectivamente. Porém, o suco de maçã ainda pode ser considerado um alimento funcional pela presença de alguns fenóis e ácidos.

2.3.2 Probióticos

A palavra probiótico, que significa “para a vida”, é um termo derivado da língua grega. Em 1989, Fuller definiu probióticos como “suplemento de microrganismos vivos o qual afeta benéficamente o animal hospedeiro pelo melhoramento do balanço da microbiota intestinal” (ITSARANUWAT, AL-HADDAD e ROBINSON, 2003). No presente, os probióticos são definidos como “microrganismos viáveis (bactéria do ácido láctico ou outras bactérias e ainda leveduras aplicadas sob a forma de células secas ou em produtos fermentados) que exibem um efeito benéfico na saúde do hospedeiro, após a ingestão, pelo melhoramento das propriedades da flora natural” (GOMES e MALCATA, 1999).

A flora intestinal é fundamental para a saúde. Durante alguns meses o leite materno é o único alimento do recém-nascido, e supre todos os requerimentos nutricionais, proporcionando o desenvolvimento celular, e protegendo o recém-

nascido contra doenças infecciosas (WRIGHT et al.⁴ *apud* MARTÍN et al., 2004), isto pode explicar o porquê do leite humano fresco, coletado, exibir atividade antimicrobiana, que é inibida após a pasteurização (FORD et al.⁵ *apud* MARTÍN et al., 2004). O leite materno também contém substâncias prebióticas, que estimulam seletivamente o crescimento das bactérias e exercem efeitos positivos no intestino (DAÍ & WALKER⁶ *apud* MARTÍN et al., 2004).

O leite materno é o maior fator de iniciação e desenvolvimento da microflora do intestino neonatal e representa uma contínua fonte de microrganismos durante o período de amamentação (MARTÍN et al., 2004).

A composição microbiana do intestino é influenciada pela alimentação da criança, portanto, quando amamentada, a composição bacteriana da flora fecal da criança é reflexo da composição bacteriana do leite materno (HEIKKILÄ & SARIS⁷ *apud* MARTÍN et al., 2004). Quando ocorre a introdução de alimentos sólidos e a retirada do leite, ocorre a fase de maior mudança na microbiota intestinal e sua nova composição acompanha o desenvolvimento e a vida do portador (FAVIER et al.⁸ *apud* MARTÍN et al., 2004).

O epitélio intestinal, junto com a microflora, representa uma barreira às bactérias patogênicas, antígenos e a outras substâncias indesejadas, que podem passar do lúmen do intestino ao sangue. Quando a microflora ou as células epiteliais apresentam distúrbio, o organismo torna-se alvo de antígenos, patógenos, compostos químicos ou radiação, alterando a permeabilidade e facilitando a sua invasão no sangue (GOMES e MALCATA, 1999).

É usual a utilização da chamada “bacterioterapia” no desmame, em distúrbios gastrointestinais como também em situações de estresse, em tratamentos com antibióticos e em alergias alimentares. A bacterioterapia é uma prática que utiliza bactérias comensais ou benéficas para prevenir ou tratar a

⁴ WRIGHT, A. L. et al.. Increasing breastfeeding rates to reduce infantile illness at the community level. **Pediatrics**, v. 101, p. 837-844, 1998.

⁵ FORD, J. E. et al.. Influence of the heat treatment of human milk on some of its protective constituents. **Journal of Pediatrics**, v. 91, p. 29-35, 1977.

⁶ DAÍ, D. e WALKER, W. A. Protective nutrients and bacterial colonization in the immature human gut. **Advances in Pediatrics**, v. 46, p. 353-382, 1999.

⁷ HEIKKILÄ, M. P. e SARIS, P. E. J. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 471-478, 2003.

⁸ FAVIER, C. F. et al.. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 219-226, 2002.

colonização do hospedeiro por patógenos (HUOVINEN⁹ *apud* MARTÍN et al., 2004). Estes benefícios são fundamentados no princípio da competição exclusiva, onde a bactéria comensal ou probiótica compete com os patógenos pelo mesmo sítio de aderência (MACKIE, SGHIR e GASKINS¹⁰ *apud* MARTÍN et al., 2004).

Na tabela 2, são listados alguns benefícios e as possíveis causas e mecanismos de ação de alimentos funcionais com bactérias probióticas.

TABELA 2 - BENEFÍCIOS NUTRICIONAIS DE ALIMENTOS FUNCIONAIS, COM BACTÉRIAS PROBIÓTICAS, PARA A SAÚDE

Efeitos benéficos	Possíveis causas e mecanismos
Melhora a digestibilidade	Quebra parcial de proteínas, gorduras e carboidratos
Melhora o valor nutricional	Eleva os níveis de vitamina B e certos aminoácidos, como metionina, lisina e triptofano
Melhora a utilização da lactose	Reduz a lactose no produto e disponibiliza a lactase
Ação antagonista aos patogênicos entéricos	Desordens, como diarreia, colites, colites ulcerada, diverticulite e colites antibióticas controladas pela acidificação, inibidores microbianos e prevenção da adesão patogênica
Colonização no intestino	Sobrevivência no ácido gástrico, resistência a lisozima e baixa tensão superficial do intestino, aderência à mucosa intestinal, multiplicação no trato intestinal, modulação do sistema imunológico
Efeito anticarcinogênico	Conversão de pré-carcinógenos em compostos inofensivos; ação inibitória de alguns tipos de câncer, em particular de cânceres do trato gastrointestinal pela degradação de pré-carcinógenos, redução de enzimas promotoras do câncer e estímulo do sistema imune
Ação hipocolesterolêmica	Produção de inibidores da síntese de colesterol. Uso do colesterol pela assimilação e precipitação com desconjugação de sais biliares.
Modulação imunológica	Interação na formação dos macrófagos, estímulo da produção de células supressoras de γ -interferon.

FONTE: GOMES e MALCATA (1999)

Desde o fim de 1950 até 1980 foram publicados vários estudos sobre a sensibilidade e a resistência de bactérias lácteas a antibióticos (SOZZI e SMILEY¹¹ *apud* SALMINEN et al., 1998); muitas espécies de lactobacilos têm se mostrado resistentes a antibióticos quando presentes em grande quantidade, na ordem de 10^5 .

⁹ HOUVIEN, P. Bacteriotherapy: the time has come. **British Medical Journal**, v. 323, p. 353-354, 2001.

¹⁰ MACKIE, R. I.; SGHIR, A. e GASKINS, H. R.. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 10355-10455, 1999.

¹¹ SOZZI, T. e SMILEY, M. B. Antibiotic resistance of yoghurt starter cultures *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. **Applied Environment Microbiology**, v. 40, p. 862-865, 1980.

Esta característica é importante tanto do ponto de vista tecnológico quanto na utilização de probióticos em bacterioterapias (SALMINEN et al., 1998).

A utilização de microrganismos com propriedades funcionais nos alimentos pode contribuir com a segurança alimentar, pela produção de metabólitos como as bacteriocinas e produção de ácidos como o láctico, que baixa o pH do meio desfavorecendo o crescimento de patogênicos (LEROY e DE VUYST, 2004).

A fermentação probiótica oferece vantagens sensoriais como a produção de exopolissacarídeos e de enzimas proteolíticas e lipolíticas que modificam a textura do alimento, e com produção de aromas como o de acetaldeído (LEROY e DE VUYST, 2004).

Existem também vantagens tecnológicas no uso destes microrganismos pois é possível prevenir a pós-acidificação e proporcionar proteólises desejadas, e vantagens nutricionais como a diminuição dos teores de compostos tóxicos ou anti-nutricionais, como por exemplo a remoção de aminas biogênicas, de lactose de ácido fítico (LEROY e DE VUYST, 2004).

Em geral, para a seleção de uma bactéria probiótica é necessário o atendimento de alguns requisitos como, entre outros:

- ser autóctone, ou seja, habitante natural do trato intestinal;
- não ser patogênica ao hospedeiro;
- ter viabilidade de incorporação ao alimento;
- permanecer em grande quantidade, número mínimo exigido para um produto probiótico durante um tempo de armazenamento;
- suportar o trânsito no trato gastrointestinal, apresentando características de tolerância aos ácidos e à bile;
- ter habilidade de aderir às células do epitélio intestinal e/ou colonizar o lúmen;
- apresentar atividade antagonista aos patógenos entéricos (LEE et al.¹² *apud* FERNANDÉZ, BORIS e BARBÉS, 2003).

Diferentes espécies de microrganismos probióticos são utilizados em produtos alimentícios, incluindo os *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. johnsonii*, *L.*

¹² LEE, Y. et al. Quantitative approach in the study of adhesion lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, p. 3692-3697, 2000.

thamnosus, *L. reuteri*, *L. delbrueckii* *Bulgaricus*, *L. lactis cremoris*, *L. lactis oliacetylactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. logum*, *B. brevis*, *B. infantis*, *B. animalis*, *Streptococcus thermophilicus* (SALMINEN et al.¹³ *apud* KNORR, 1998).

O alimento probiótico deve conter elevado número de células do microrganismo, no mínimo de 10^6 UFC/mL da bactéria (ROBINSON¹⁴ *apud* SHAH, 2000) ou uma ingestão diária entre 10^8 a 10^{11} UFC/dia para que ocorra o efeito benéfico desejado (VINDEROLA e REINHEIMER¹⁵ *apud* OLIVEIRA e DAMIN, 2003; DINAKAR e MISTRY¹⁶ *apud* VINDEROLA et al, 2000). É importante também que as células dos microrganismos permaneçam estáveis, ou seja, o número mínimo necessário da bactéria deve estar presente durante todo o tempo de armazenamento (NIGHSWONGER, BRASHEARS e GILLILAND, 1996).

Segundo Saxelin et al. (1999), a sobrevivência e a viabilidade celular das bactérias probióticas são dependentes da espécie e da tecnologia de produção e por isso é comum a utilização de duas bactérias para a fermentação de um substrato; uma bactéria suporte e outra probiótica. A bactéria suporte tem a função de dar corpo ao produto pela síntese de exopolissacarídeos, e também a de promover o crescimento das bactérias probióticas, baixando o pH e estimulando seu crescimento. Porém, os mesmos autores relatam que alguns produtos elaborados somente com bactérias probióticas apresentam maior estabilidade microbiológica durante o armazenamento.

As bactérias probióticas mais pesquisadas são as do grupo das bactérias lácticas e seus gêneros incluem o *Lactobacillus*, o *Lactococcus*, o *Streptococcus*, alguns *Enterococcus* e também são representadas pelo gênero *Bifidobacterium* (SALMINEN e VON WRIGHT, 1993; FERNÁNDEZ, BÓRIS e BARBÉS, 2003). E, as mais utilizadas em alimentos lácteos probióticos incluem os *Lactobacillus*, *Lactococcus* e o *Leuconostoc* (KNORR, 1998).

¹³ SALMINEN, S. et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **British Journal of Nutrition**, v. 80, Suppl. 1, p. 5147-5171, 1998.

¹⁴ ROBINSON, R. K. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in fermented products. **Suid Afrikaanse Tydskrif Vir Suiwelkunde**, v. 19, p. 25-27, 1987.

¹⁵ VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *Lactobacillus acidophilus* and lactic starter in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 271-275, 2000.

¹⁶ DINAKAR, P. e MISTRY, V. V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2854-2864, 1994.

Para algumas espécies de microrganismos, os habitats são diversos, como é o caso do *Lactobacillus casei* (TABELA 3).

TABELA 3 – HABITATS DOS *Lactobacillus casei*

Habitat	Exemplos
	Elaborados pelo homem
Alimentos fermentados	Queijo, produtos derivados de frutas e vegetais ou cereais
Alimentos em decomposição	Leite, carne, caldo de cana, e alimentos ácidos como suco de frutas, saladas de maionese e conservas de peixe
Silagem	
Esgoto	
	Natural
Humanos e animais	Membranas mucosas (boca, trato intestinal, e genital feminino)
Plantas em decomposição	
FONTE: HAMMES e HERTEL, 2002	

Fuller¹⁷, citado por Fernández, Bóris e Barbés (2003), propôs a teoria de que os probióticos podem manter a microbiota benéfica do intestino pela exclusão competitiva e ação antagonista às bactérias patogênicas do intestino e, sua efetividade de benefícios é dependente de sua habilidade de sobrevivência às condições gástricas e à colonização do intestino, e temporariamente, de adesão ao epitélio intestinal.

¹⁷ FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

2.3.2.1 Bactérias láticas

As bactérias láticas ou bactérias do ácido láctico (LAB) estão incluídas no grupo das bactérias Gram-positivas, não-esporuladas, que convertem carboidratos em ácido láctico. Fermentam glucose, lactose, frutose, galactose, maltose, manose e sacarose, crescem em diferentes temperaturas, em alta concentração de sal e são tolerantes tanto a meios ácidos quanto a alcalinos (SALMINEN e VON WRIGHT, 1993).

Entre os benefícios relacionados à saúde encontram-se o melhoramento da absorção de nutrientes no trato intestinal, a modulação do sistema imunológico, efeitos anti-hipertensivos, atividade antimicrobiana, produção de ácidos orgânicos (lático, fórmico, fenilático e capríco), dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, etanol, compostos aromáticos e bacteriocinas, e aproveitamento de minerais, especialmente o cálcio. As bacteriocinas probióticas são peptídeos de baixo peso molecular ou proteínas com características antimicrobianas restritas às bactérias Gram-positivas (LEROY e DE VUYST, 2004).

As bactérias láticas são amplamente utilizadas na produção de alimentos, na fermentação de leite, vegetais, salsichas, bebidas e produtos de panificação resultando em produtos com composição e sabor modificados e com vida de prateleira prolongada (KNORR, 1998).

Apresentam importância econômica e nutricional devido ao seu uso na produção e preservação de vários produtos fermentados. Em particular, tem ocorrido o aumento na produção de leites fermentados com o grupo de *Lactobacillus casei* (Tabela 4) (MÄYRÄ-MÄKINEN e BIGRET¹⁸ apud PÉANT e LAPOINT, 2004; VINDEROLA et al., 2000), possivelmente pelo seu sistema proteolítico que contribui para a liberação de peptídeos bioativos da matéria-prima (WOUTERS et al.¹⁹ apud LEROY e DE VUYST, 2004).

¹⁸ MÄYRÄ-MÄKINEN, A. e BIGRET, M. **Industrial use and production of lactic acid bacteria.** Lactic acid bacteria – microbiology and functional aspects. Nova Iorque: Marcel Dekker, p. 73-102, 1998.

¹⁹ WOUTERS, J. T. M. et al. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 91-109, 2002.

TABELA 4 - ALIMENTOS E BEBIDAS FERMENTADOS E SUA ASSOCIAÇÃO ÀS BACTÉRIAS LÁTICAS

Tipos de produtos fermentados	Bactéria láctica
Produtos lácteos	
- Queijos duros sem olhos	<i>L. lactis lactis</i> , <i>L. lactis cremoris</i>
- Queijos com olhaduras pequenas	<i>L. lactis lactis</i> , <i>L. lactis cremoris diacetylactis</i> , <i>L. lactis cremoris</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides cremoris</i>
- Queijos tipo italiano e suíço	<i>Lb. delbrueckii lactis</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. delbrueckii bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>
- Manteiga	<i>L. lactis lactis</i> , <i>L. lactis lactis diacetylactis</i> , <i>L. lactis cremoris</i> , <i>Leuc. Mesenteroides cremoris</i>
- Iogurte	<i>Lb. delbrueckii bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>
- Leite fermentado e probiótico	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i>
- Kefir	<i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. kefiranoformis</i> , <i>Lb. brevis</i>
Carnes fermentadas	
- Salsichas fermentadas (Europa)	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i>
- Salsichas fermentadas (EUA)	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
- Produtos fermentados de peixe	<i>Lb. alimentarius</i> , <i>C. piscicola</i>
Vegetais fermentados	
- Sauerkraut	<i>Leuc. Mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>P. acidilactici</i>
- Picles	<i>Leuc. Mesenteroides</i> , <i>P. cerevisiae</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i>
- Olivas fermentadas	<i>Leuc. Mesenteroides</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. plantarum</i>
Vegetais fermentados	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. fermentum</i>
Molho de soja	<i>T. halophilus</i>
Bebidas alcoólicas	
- Vinho	<i>O. oeni</i>
- Vinho de arroz	<i>Lb. sakei</i>

B. = *Bifidobacterium*, C. = *Carnobacterium*, L. = *Lactococcus*, Lb. = *Lactobacillus*, Leuc. = *Leuconostoc*, O. = *Oenococcus*, P. = *Pediococcus*, S. = *Streptococcus*, T. = *Tetragenococcus*.

FONTE: LEROY e DE VUYST (2004)

Gênero *Lactobacillus*

A maioria das bactérias do ácido láctico pertence ao gênero *Lactobacillus*, que é heterogêneo, com variedades fenotípicas e propriedades bioquímicas e fisiológicas diferenciadas. Esta heterogeneidade é reflexo da relação da porcentagem das bases nitrogenadas, guanina (G) e citosina (C) do DNA, que varia de 32 a 53%, ou seja, a espécie de lactobacilos estudada pode ser identificada de acordo com a porcentagem de guanina-citosina encontrada (SALMINEN e VON WRIGHT, 1993).

As vias clássicas para distinguir as diferentes espécies deste grupo têm sido o carboidrato de fermentação, a configuração do ácido láctico produzido e a capacidade de hidrolisar a arginina num meio de crescimento de composição específica. Ainda podem ser utilizadas análises de peptideoglicanos, e a

porcentagem de G+C do DNA, e estudos de homologia de DNA-DNA (SALMINEN e VON WRIGHT, 1993).

São microrganismos Gram-positivos, não esporulados, não flagelados, microaerófilos ou anaeróbicos, estritamente fermentativos, podendo ser encontrados na forma unicelular, em pares ou em cadeias curtas, halotolerantes e benzidina negativo. Fermentam amigdalina, celobiose, frutose, galactose, glucose, lactose, maltose, manose e sacarose, sendo capazes de sintetizar β -galactosidase e β -frutofuranosidase. A temperatura ideal de crescimento encontra-se na faixa de 35 a 40°C, a acidez titulável de 0,3 a 1,9 g por 100 mL e o pH entre 5,5 e 6,0. Gomes e Malcata, (1999) relataram que até 1999 eram conhecidas cientificamente 56 espécies de *Lactobacillus* (TABELA 5).

TABELA 5 – LISTA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Lactobacillus*

<i>Lactobacillus</i>		
<i>L. acetotolerans</i>	<i>L. fructivorans</i>	<i>L. murinus</i>
<i>L. acidophilus</i> ^a	<i>L. fructosus</i>	<i>L. oris</i> ^a
<i>L. agilis</i>	<i>L. gallinarum</i>	<i>L. parabuchneri</i> ^a
<i>L. alimentarius</i>	<i>L. gasseri</i> ^a	<i>L. paracasei</i> ^a
<i>L. amylophilus</i>	<i>L. graminis</i>	<i>L. pentosus</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>L. halotolerans</i>	<i>L. pontis</i>
<i>L. avarius</i>	<i>L. hamsteri</i>	<i>L. plantarum</i> ^a
<i>L. bifementans</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. reuteri</i> ^a
<i>L. brevis</i> ^a	<i>L. hilgardii</i>	<i>L. rhamnosus</i> ^a
<i>L. buchneri</i> ^a	<i>L. homohiochii</i>	<i>L. ruminis</i>
<i>L. casei casei</i> ^a	<i>L. intestinalis</i>	<i>L. sake</i>
<i>L. collinoides</i>	<i>L. jensenii</i> ^a	<i>L. salivarius</i> ^a
<i>L. confusus</i>	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. sanfrancisco</i>
<i>L. coryniformis</i>	<i>L. kandleri</i>	<i>L. sharpeae</i>
<i>L. crispatus</i> ^a	<i>L. kefir</i>	<i>L. suebicus</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>L. kefiranoferiens</i>	<i>L. vaccinosus</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. malefermentans</i>	<i>L. vaginalis</i> ^a
<i>L. farciminis</i>	<i>L. mali</i>	<i>L. viridescens</i>
<i>L. fermentum</i> ^a	<i>L. minor</i>	

^a Espécies isoladas de humanos

FONTE: GOMES e MALCATA (1999)

Os lactobacilos estão distribuídos em diversos nichos ecológicos, como o da cavidade oral (SALMINEN e VON WRIGHT, 1993), trato gastrointestinal e o genital do homem e de outros animais (GOMES e MALCATA, 1999). São geralmente tolerantes ao ácido e são bactérias de fermentação terminal de silagens e vegetais. Algumas espécies, por exemplo, *L. brevis*, *L. casei*, e *L. plantarum*, podem ser encontradas em diferentes habitats (SALMINEN e VON WRIGHT, 1993) sua

distribuição depende de alguns fatores como o pH, a disponibilidade de oxigênio, concentração de substratos específicos e interações bacterianas (GOMES e MALCATA, 1999).

As bactérias do ácido lático produzem polímeros glicídicos, estruturas importantes para as características físicas e sensoriais de alguns produtos, como para o corpo e textura (DE VUYST e DEGEEST, 1999). É o caso do *L. casei* CRL 87, que em meio contendo galactose como fonte de carbono produz exopolissacarídeos (MOZZI et al., 2001).

Na tabela 6 são apresentadas algumas funções e aplicações de *Lactobacillus* sp geneticamente modificados.

TABELA 6 – FUNÇÕES E APLICAÇÕES DE *Lactobacillus* sp. GENETICAMENTE MODIFICADOS

Funções	Aplicações
Eficiência de fermentação	Sistemas de metabolismo da lactose e proteolítico
Propriedades nutricionais	Síntese vitamínica
Propriedades sensoriais	Sabor, textura, aparência
Vida de prateleira, segurança	Biopreservativos
Resistência fagocítica	
Estabilidade fenotípica	Integração cromossômica
Efeitos terapêuticos	Redução de colesterol
	Exclusão competitiva
	Atividade anticarcinogênica
	Fatores de colonização
Novos tratamentos	Produção enzimática

FONTE: ARIHARA e LUCHANSKY²⁰ citado por KNORR (1998)

Os dados da literatura, sobre os *Lactobacillus* e as *Bifidobacterium* indicam que não há efeitos contrários aos dos benefícios à saúde, observados em estudos clínicos controlados (SALMINEN et al., 1998).

➤ *Lactobacillus casei*

Entre as atividades funcionais comprovadas dos *Lactobacillus casei* estão:

- sua eficiência contra diarreia provocada por rotavírus e à associada à antibióticos, pela diminuição do pH pela produção de ácido lático, tornando

²⁰ ARIHARA, K. e LUCHANSKY, J. B. **Dairy Lactobacilli**. Food Biotechnology: Microorganisms. Nova Iorque: VCH, p. 609-643, 1993.

- o meio desfavorável aos patógenos (GUANDALINI et al., 2000 e ITSARANUWAT, AL-HADDAD e ROBINSON, 2003);
- são estimulantes do sistema imunológico, pela produção de anticorpos (DELNESTE, HUGHES e SCHIFFRIN, 1998);
 - abrandam os sintomas da doença de Crohn (BORRUEL et al.²¹ *apud* ITSARANUWAT, AL-HADDAD e ROBINSON, 2003);
 - apresentam propriedades antimicrobianas, como a produção de bacteriocinas e a produção do próprio ácido láctico (CATS et al., 2003);
 - diminuem o risco de alguns tipos de câncer pela redução dos teores de pró-carcinógenos (ITSARANUWAT, AL-HADDAD e ROBINSON, 2003);
 - diminuem o teor de colesterol, ou por desconjugação do sais biliares ou por adesão à molécula de colesterol e posterior eliminação pelas fezes (BRASHEARS, GILLILAND e BUCK, 1998).

Existem estudos relacionados ao consumo de *L. casei* e à diminuição do crescimento de *Helicobacter pylori*, responsável por úlceras pépticas, gastrites crônicas e câncer gástrico em humanos. Os microrganismos probióticos, em especial, os lactobacilos, têm demonstrado a diminuição da colonização e do crescimento do *H. pylori* em humanos, pela produção de bacteriocinas e ácido láctico (CATS et al, 2003). Os lactobacilos são provavelmente os microrganismos probióticos mais estudados e têm a habilidade de aderir à parede do estômago e crescer sob condições de baixo pH (CATS et al., 2003).

➤ *Lactobacillus acidophilus*

São caracterizados pela morfologia não esporulada, sendo Gram-positivos, ocorrem de forma isolada, em pares ou em cadeias curtas, sem flagelos, são tolerantes ao sal e a baixos teores de oxigênio - microaerófilos (GOMES e MALCATA, 1999). Habitantes naturais do intestino grosso secretam ácido láctico diminuindo o pH intestinal e inibindo o desenvolvimento de patógenos invasivos

²¹ BORRUEL, N. et al. Mucosal tumour necrosis factor can be down-regulated by probiotic bacteria. *Gut*, v. 51, p. 659-664, 2002.

como *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. Agem pela competição por sítios de ligação no intestino e por nutrientes com as bactérias patogênicas, reduzindo assim o tempo de pós-infecção (ALM²² *apud* ITSARANUWAT, AL-HADDAD e ROBINSON, 2003). A ingestão de número elevado de microrganismos probióticos pode estimular o sistema imune do hospedeiro contra patógenos Gram-positivos (GLUCK e GEBBERS²³ *apud* ITSARANUWAT, AL-HADDAD e ROBINSON, 2003) e diminuir o teor de colesterol sanguíneo (BRASHEARS, GILLILAND e BUCK, 1998).

Os *Lactobacillus acidophilus* podem ser encontrados em iogurtes, leites acidófilos (NAHAISI e ROBINSON²⁴ *apud* ITSARANUWAT, AL-HADDAD e ROBINSON, 2003) ou no leite “sweet” acidófilo (SPECK²⁵ *apud* ITSARANUWAT, AL-HADDAD e ROBINSON, 2003).

Os benefícios para saúde e nutricionais dos *Lactobacillus acidophilus* e do *Lactobacillus casei* incluem a redução dos sintomas da intolerância à lactose (WOUTERS et al.²⁰ *apud* LEROY e DE VUYST, 2004; NAKASAWA e HOSONO²⁶ *apud* VINDEROLA et al. 2000; KIM e GILLILAND²⁷ *apud* NIGHSWONGER, BRASHEARS e GILLILAND, 1996), inibição de microrganismos patogênicos e vírus, produção de vitaminas, redução dos níveis de colesterol, efeitos inibitórios sobre tumores (NIGHSWONGER, BRASHEAR e GILLILAND, 1996), modulação da resposta imunológica, estabilização de uma barreira na mucosa intestinal e controle de desordens intestinais (NIGHSWONGER, BRASHEARS e GILLILAND, 1996; KAILASAPATHY e RYBKA²⁸ *apud* VINDEROLA et al. 2000).

Os *Lactobacillus* têm sido consumidos diariamente desde o início do uso dos leites fermentados como alimentos. As espécies probióticas, como os *Lactobacillus*

²² ALM, L. **The therapeutic effects of various cultures**. Therapeutic Properties of Fermented Milks. London: Elsevier Applied Science, p. 45-64, 1991.

²³ GLUCK, U. e GEBBERS, J. O. Ingested probiotics reduce nasal colonization with pathogenic bacteria. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p. 517-520, 2003.

²⁴ NAHAISI, M. H. e ROBINSON, R. K. Acidophilus drinks: the potential for developing countries. **Dairy Industries International**, v. 50, p. 16-17, 1985.

²⁵ SPECK, M. L. The development of sweet acidophilus milk. **Dairy and Ice Cream Field Journal**, v. 70A-D, 1978.

²⁶ NAKASAWA, Y. e HOSONO, A. **Functions of Fermented Milk**. London: Elsevier Applied Science, 1992.

²⁷ KIM, H. S. e GILLILAND, S. E. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 959, 1983.

²⁸ KAILASAPATHY, K e RYBKA, S. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. – their therapeutic potential and survival in yogurt. **Australian Journal Dairy Technology**, v. 52, p. 28-33, 1997.

acidophilus são utilizadas seguramente há mais de 80 anos (SALMINEN et al., 1998).

➤ Fermentação por Bactérias Lácticas

As primeiras produções de alimentos fermentados foram realizadas por fermentação espontânea resultante da microflora natural presente na matéria-prima. O processo de fermentação foi otimizado com a utilização do inóculo na matéria-prima, com uma pequena quantidade do produto da fermentação anterior. Atualmente faz-se a adição de culturas selecionadas, resultando num alto grau de controle sobre o processo fermentativo e padronização do produto final (LEROY e DE VUYST, 2004).

A fermentação é um processo que facilita a digestibilidade pela degradação de estruturas complexas em simples, como a transformação de proteínas em aminoácidos, modifica a qualidade da matéria-prima, promovendo propriedades de segurança, impedindo o crescimento de microrganismos patogênicos e também alterando as características físico-químicas no produto. Este processo é também utilizado para a fabricação de alimentos probióticos e para a multiplicação dos microrganismos elevando sua contagem até o número mínimo necessário (KNORR, 1998).

As bactérias lácticas podem utilizar duas vias fermentativas de açúcares para a produção de metabólitos, a via glicolítica e a via 6-fosfogluconato/fosfocetolase. A primeira realiza a glicólise anaeróbica (via Embden-Meyerhof-Parnass) e tem como produto final o ácido láctico, com rendimento de 1,8 mol de ácido láctico/mol de glucose, assim conhecida como fermentação homolática. A via metabólica do 6-fosfogluconato/fosfocetolase produz quantidades significativas de outros produtos, como o etanol, o acetato, e o CO₂, juntamente com o ácido láctico, por isso, este metabolismo é denominado de fermentação heterolática (LEROY e DE VUYST, 2004).

A fermentação láctica proporciona ao alimento um maior tempo de conservação pela formação do ácido, a produção de compostos aromatizantes como o acetaldeído e aumento do valor nutricional do alimento mediante a síntese de

aminoácidos e vitaminas do grupo B (ITSARANUWAT, AL-HADDAD e ROBINSON, 2003).

A composição e as condições do meio de crescimento, como a presença de açúcares, ácidos, meio sob condição anaeróbica, temperatura entre outros fatores, podem alterar a formação do produto final por diferentes bactérias lácticas. Esta mudança pode ser atribuída à alteração do metabolismo do piruvato e/ou uso externo de aceptadores de elétrons como o oxigênio ou compostos orgânicos (LEROY e DE VUYST, 2004).

É sabido que o D- e o L-ácido láctico são produzidos por bactérias lácticas homo e heterofermentativas pela fermentação de açúcares, entretanto, em alguns casos, ácidos orgânicos também podem ser utilizados como fonte de energia por estas bactérias, durante transformações bioquímicas (GOMIS, GUTIERREZ e MORAN²⁹ *apud* GÖKMEN, ACAR e TAYDAS, 2003).

As bactérias lácticas metabolizam açúcares e o L-ácido málico em L-ácido láctico (ACAR, GÖKMEN e TAYDAS³⁰ *apud* GÖKMEN, ACAR e TAYDAS, 2003) e segundo Salminen e Von Wright (1993) os *Lactobacillus casei* podem usá-lo como única fonte de energia. Esta conversão bacteriana pode ocorrer por duas vias: pela degradação do ácido málico pela enzima málica e pela fermentação malolática (GARCERÁ et al., 1992; ACAR, GÖKMEN e TAYDAS³¹ *apud* GÖKMEN, ACAR e TAYDAS, 2003).

Muitas das bactérias lácticas são capazes de descarboxilar o L-ácido málico pela enzima málica NAD⁺-dependente que catalisa a descarboxilação formando o piruvato e liberando CO₂. Em seguida o piruvato é convertido, gerando ATP, em L-ácido láctico e CO₂, ou seja, na presença de altas concentrações de glucose e malato, uma permease específica é induzida e transporta o malato para dentro da célula onde o ácido málico é degradado pela enzima málica (LONDON³¹ *apud* GARCERÁ et al., 1992; GUMP e PRUETT, 1993). Esta enzima já foi isolada do *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e do *Lactobacillus marinus*, o

²⁹ GOMIS, D. B., GUTIERREZ, M. D. e MORAN, M. J. **Journal of Institute Brew**, v. 97, p. 453-456, 1991.

³⁰ ACAR, J.; GÖKMEN, V. e TAYDAS, E. E. **European Food Research and Technology**, v. 209, p. 308-312, 1999.

³¹ LONDON, J. Uncommon pathways of metabolism among lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 87, p. 103, 1990.

pH ótimo para sua atividade encontra-se entre 5,6 e 6,1 (CASPRITZ e RADLER³² *apud* GARCERÁ et al., 1992). Esta atividade enzimática também já foi observada em alguns *Enterococcus faecalis* e em *Lactobacillus casei* (LONDON³² *apud* GARCERÁ et al., 1992).

A outra via de transformação é a conversão do malato em lactato e CO₂ que ocorre na co-fermentação do ácido com um carboidrato fermentável, esta fermentação é chamada de malolática (SALMINEN e VON WRIGHT, 1993). A fermentação malolática ocorre pela descarboxilação bacteriana do ácido málico em ácido láctico com liberação de gás carbônico. Segundo Aquarone, Lima e Borzani (1983), as bactérias lácticas responsáveis pela fermentação malolática são as dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*.

O desempenho das bactérias lácticas na co-fermentação málica com um carboidrato geralmente é benéfico, pois aumenta a razão de seu crescimento quando comparado com o crescimento somente com glucose (PILONE e KUNKEE³³ *apud* SALMINEN e VON WRIGHT, 1993).

A fermentação malolática é importante na produção de vinhos e sidra, proporciona aumento de pH, devido ao ácido láctico ser mais fraco do que o ácido málico (VARNAM e SUTHERLAND, 1999), estabilidade microbiológica, e melhora as características sensoriais do produto final (BEELMAN e GALLANDER³⁴ *apud* GARCERÁ et al., 1992).

Em algumas tecnologias, a fermentação malolática é requerida, pois converte o ácido málico em láctico antes de metabolizar significativamente os açúcares e promove a caracterização do produto (JOHANNINGSMEIER, FLEMING e BREIDT, 2004).

³² CASPRITZ, G. e RADLER, F. Malolatic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 258, p. 907, 1983.

³³ PILONE, B. e KUNKEE, R. E. Stimulatory effect of malolática fermentation on the growth rate of *Leuconostoc oenos*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 32, p. 405-408, 1976.

³⁴ BEELMAN, R. B. e GALLANDER, J. F. Wine deadification. **Advance Food Research**, v. 25, p. 1, 1979.

2.3.2.2 Produtos e pesquisas com probióticos

Os produtos lácteos suplementados com *Lactobacillus acidophilus* têm ganhado considerável atenção, e por esta razão, maior número destes produtos estão ao alcance do público (NIGHSWONGER, BRASHEARS E GILLILAND, 1996). No mercado brasileiro, esta diversidade de produtos probióticos é de bebidas lácteas, como Yakult, Batavito, Chamyto, Bebida Láctea Frimesa, entre outros.

Na literatura são encontrados resultados de pesquisas referentes aos produtos probióticos relacionados ao desenvolvimento de novos produtos, mecanismos de ação, fisiologia, propriedades bioquímicas, tecnológicas e terapêuticas dos microrganismos.

Tamime e Marshall³⁵, citado por Knorr (1998), comentam a utilização de bifidobactérias em alguns produtos lácteos como em sorvete (Biogarde), queijo fresco, queijo Gouda, e para o crescimento em leite ultrafiltrado.

Saxelin³⁶, citado por Knorr (1998), estudou a administração de duas concentrações de *Lactobacillus GG*, anteriormente liofilizados, 10^6 a 10^8 UFC/dia. Nesta forma não apresentaram suas propriedades probióticas, porém quando aplicados em leites fermentados, sua eficácia foi identificada pela colonização intestinal.

Antoine³⁷ citado por KNORR (1998) verificou que a fermentação do leite por *Streptococcus thermophilus*, seguida de tratamento térmico, resulta na retenção da atividade da lactase gerada durante o processamento, e segundo KNOOR (1998), isto pode ajudar na absorção da lactose em indivíduos lactose intolerantes.

Neves (2000) produziu um derivado de leite de cabra não fermentado com bactérias probióticas, para alérgicos às proteínas do leite de vaca.

Mozzi et al. (2001) investigaram o efeito de fontes de carbono, galactose e glucose, na produção de exopolissacarídeos e as atividades das enzimas envolvidas

³⁵ TAMINE, A. Y. E MARSHALL, V. M. E. Microbiology and technology of fermented milks. **Microbiology and biochemistry of cheese fermented milk**. London: Blackie Academic & Professional, p. 57-152, 1997.

³⁶ SAXELIN, M. *Lactobacillus GG* – a human probiotic strain with thorough clinical documentation. **Food Reviews International**, v. 13, p. 293-313, 1997.

³⁷ ANTOINE, J. M. Comunicação pessoal, 1998.

na síntese nucleotídeos de açúcar por *Lactobacillus casei* CRL 87 e, perceberam que a fonte de carbono não interferiu no crescimento dos microrganismos.

Nighswonger, Brashears e Gilliland (1996) investigaram a viabilidade de cinco cepas de *Lactobacillus acidophilus* e uma de *Lactobacillus casei* adicionadas ao iogurte e à cultura de fermentação do leite, durante 28 dias sob estoque refrigerado de 5 a 7°C. O primeiro microrganismo apresentou perda de viabilidade tanto no iogurte como no leite de 1 ciclo log em 28 dias, enquanto que o segundo perdeu a viabilidade.

Fernández, Bóris e Barbés (2003) estudaram duas espécies de *Lactobacillus* (*L. acidophilus* e *L. gasser*), isoladas do intestino humano, que apresentam propriedades bioterapêuticas no trato genitourinário. Foi analisada sua tolerância à ácidos biliares, sua aderência às células epiteliais do intestino e seu efeito antagonista, *in vitro*, contra algumas bactérias enteropatogênicas. Os pesquisadores concluíram que as duas espécies de *Lactobacillus* isoladas do trato genitourinário humano apresentaram importantes propriedades de sobrevivência na colonização do trato gastrointestinal, o que proporciona à estas bactérias potencial probiótico.

Capra, Quiberoni e Reinheimer (2004) verificaram a sobrevivência de bacteriófagos de *Lactobacillus casei* e *L. paracasei*, quando submetidos à tratamentos térmicos (63, 72 e 90°C) e químicos (tampão de tri-magnésio gelatina, Man Rogosa Sharpe (MRS) e leite desnatado reconstituído). Os dados coletados têm significância para desenvolver procedimentos mais efetivos de controle de fagos em indústrias lácticas e laboratórios.

Péant e LaPointe (2004) demonstraram e caracterizaram a atividade da nuclease do lactobacilos do leite relatado como grupo do *Lactobacillus casei*. Esta enzima é uma forma de barreira à incorporação de DNA exógeno, ou seja, uma barreira à mutação. Todas as cepas testadas secretaram nuclease, indicando que esta característica é pertencente a diversas espécies de lactobacilos encontrados no leite. A produção desta enzima pode contribuir com uma diminuição na habilidade do *Lactobacillus* spp. de transformar e manter DNA exógeno.

Saxelin et al. (1999) analisaram a viabilidade de seis espécies de *Lactobacillus* armazenadas, uma de *Bifidobacterium* e uma de *Lactococcus*, sob congelamento e a 4°C e, sua utilização na fermentação de produtos fermentados. Concluíram que quando as espécies probióticas eram combinadas com culturas de

iogurte, diminuía a contagem de algumas bactérias probióticas durante o tempo de armazenamento.

Cats et al. (2003) investigaram um preparado comercial contendo *Lactobacillus casei* inibidor de *Helicobacter pylori in vitro*, e se o consumo regular da bebida afeta a colonização gástrica de *H. pylori*. O resultado foi a diminuição da colonização de *H. pylori*.

Na tabela 7 são discriminados diversos produtos encontrados mundialmente, elaborados com bifidobactérias e lactobacilos.

TABELA 7 – PRODUTOS COMERCIAIS CONTENDO ESPÉCIES DE BIFIDOBACTÉRIAS E LACTOBACILOS

Produto	País de Origem	Microrganismos
A-38	Dinamarca	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> spp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus mesofílicos</i> .
Manteiga acidófila	USA	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> spp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus mesofílicos</i> .
Progurt	USA	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactococcus mesofílicos</i> .
Leite acidófilo	Diversos países	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Leite acidófilo com levedura	Rússia	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Saccharomyces fragilis</i> , <i>S. cerevisiae</i>
A-B Iogurte	França	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> .
Cutura	Dinamarca	Idem
Milky	Itália	Idem
Nu-Trish AB/ Milk	USA	Idem
Biomild	Diversos países	<i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Lactobacillus acidophilus</i> .
Iogurte acidófilo (ACO-iogurte)	Diversos países	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> .
B-Active	França	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>L. delbrueckii bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> .
Fresh BA	UK	Idem
Kyr	Itália	Idem
Yoplus	Austrália	Idem
Biogarde	Alemanha	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Ofilus	França	Idem
Philus	Noruega	Idem
Bifidus milk	Diversos países	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>B. longum</i> .
Bifighurt	Alemanha	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> .
Biogurt	Alemanha	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> .
Biokys	República Czech	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> .
Mil-Mil	Japão	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>B. breve</i> .
Akult	Japão	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>L. casei casei</i> .

FONTE: GOMES e MALCATA (1999)

2.4 ANÁLISE SENSORIAL

As bactérias lácticas contribuem para o aroma e sabor dos produtos fermentados. O processo de fermentação com estas bactérias proporciona, sensorialmente ao alimento, o gosto ácido e freqüentemente exerce atividades proteolíticas e lipolíticas modificando a textura e produz compostos aromáticos (LEROY e DE VUYST, 2004).

As transformações do alimento durante o processamento, como o consumo de açúcares, a produção de ácidos e compostos aromáticos, proporcionados pelas fermentações, além de modificarem a composição do alimento, lhe atribuindo novas características sensoriais, como modificações na textura, tanto pela biomassa celular, como pela produção de polissacarídeos, também contribuem no perfil de sabor e aroma do produto final (LEROY e DE VUYST, 2004). A análise sensorial na indústria de alimentos é fator importante para tomada de decisões, como a avaliação da qualidade dos produtos novos, na reformulação e redução de custos dos alimentos e também para analisar as relações entre processo/ingredientes nas características sensoriais (PAL, SACHDEVA e SINGH³⁸ *apud* KONKEL et al., 2004).

A análise sensorial é o processo aplicado no final do desenvolvimento de um produto, pois se torna necessária a sua caracterização sensorial e verificar qual sua aceitação pelo público alvo. As análises mais indicadas a subsidiar estes dados são a análise descritiva quantitativa (ADQ) e a análise sensorial de aceitação (DUTCOSKY, 1996).

Os testes sensoriais utilizam os sentidos como instrumento de medida. Os métodos analíticos são efetivos para detectar modificações em propriedades físico-químicas que ocorrem durante o processamento e armazenamento dos alimentos mas são incapazes de medir as alterações que afetam a aceitação de um produto (CARDELLO e CARDELLO³⁹ *apud* DELLA TORRE et al., 2003).

³⁸ PAL, D.; SACHDEVA, S.; SINGH, S. Methods for determination of sensory quality of foods: A critical appraisal. **Journal of Food Science**, v.32, n. 5, p. 357- 367, 1985.

³⁹ CARDELLO, H.M.A B.; CARDELLO, L. Teor de vitamina C, atividade de ascorbato oxidase e perfil sensorial de manga (*Mangífera indica* L.) var. haden, durante o amadurecimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n. 2, p. 211-217, 1998.

A Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) proporciona a descrição e quantificação das características sensoriais de um produto (STONE et al.⁴⁰ *apud* DELLA TORRE et al., 2003), como a aparência, aroma, sabor e textura (DUTCOSKY, 1996).

Os testes afetivos são utilizados quando se necessita conhecer a atitude, positiva ou negativa, dos consumidores com relação ao produto (FERREIRA⁴¹ *apud* KONKEL et al., 2004), ou seja, analisam o quanto uma população gostou do mesmo.

⁴⁰ STONE, H. et al. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. **Food Technology**. v.28, n.11, p.24-34, 1974.

⁴¹ FERREIRA, V.L.P. (Coord.). **Análise sensorial – Testes discriminativos e afetivos**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, p. 73-77, 2000. (Manual Série Qualidade).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho foi desenvolver um fermentado probiótico de suco de maçã com *Lactobacillus*, para isso torna-se necessário:

- ❖ Avaliar o crescimento de *Lactobacillus casei* (Lcc) e de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) em suco clarificado de maçã, das variedades Gala e Fuji;
- ❖ Identificar o microrganismo, variedade de maçã e condições de fermentação, tempo e pH, ideais para a produção do fermentado probiótico de suco de maçã;
- ❖ Avaliar a viabilidade probiótica do fermentado, armazenado por 28 dias sob refrigeração;
- ❖ Avaliar o crescimento de Lcc em suco de maçã Sansa;
- ❖ Caracterizar sensorialmente o suco de maçã Gala e, o fermentado probiótico de suco de maçã nos tempos 0 e 30 dias de armazenamento a 8°C; e
- ❖ Verificar a aceitabilidade de três formulações do suco de maçã Gala fermentado com Lcc.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Culturas probióticas liofilizadas, prontas para uso direto (DVS – Direct Vat Set), industrializadas pela Christian Hansen Ind. & Com. Ltda, *Lactobacillus casei* (Lcc) e *Lactobacillus acidophilus* (La-5) e, sucos clarificados de maçãs comerciais das variedades Gala, Fuji e Sansa.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo do Suco de Maçã

As frutas foram selecionadas, lavadas, trituradas em processador (Processador Master Super - Walita) e prensadas (Eureka). Após a extração do suco, este foi tratado enzimaticamente com pectinase (Pectinex - 30 mL/100L) mantido a 50°C por 2 horas. Em seguida o suco foi filtrado (Papel filtro, 90 cm de diâmetro – Prolab) e clarificado com gelatina (sem sabor, incolor, natural, Royal - 3g/100L) por 2 horas, filtração, tratamento com bentonite (40g/100L) por mais 2 horas, filtração, envase e pasteurização (60°C por 30 minutos) (GÖKMEN, ACAR e TAYDAS, 2003; WOSIACKI et al., 1989).

4.2.2 Preparo do Inóculo

As culturas foram inoculadas em leite desnatado reconstituído – LDR (Molico) a 10% e incubadas a 37° C por 18 horas. Para o acompanhamento do crescimento celular em banho termostatizado utilizou-se caldo MRS e suco de maçã Gala, além de LDR 10%, incubados a 37°C por 18 horas.

4.2.3 Acompanhamento do Crescimento Celular

O volume de 40 mL de inóculo de cada cultura, contendo 10^8 UFC/40 mL do microrganismo, foi transferido para erlenmeyers, esterilizados contendo 360 mL de suco pasteurizado de maçã e incubados a 37° por 20 horas.

4.2.4 Tratamentos dos Meios para o Acompanhamento do Crescimento Celular

Os inóculos com *Lactobacillus casei* ou *Lactobacillus acidophilus* foram adicionados em suco de maçã com pH original (4,0) ou 5,5 (pH ajustado com adição de hidróxido de sódio 0,1N estéril):

T1 - *Lactobacillus acidophilus* + suco de maçã da variedade Fuji;

T2 – *Lactobacillus acidophilus* + suco de maçã da variedade Gala;

T3 – *Lactobacillus casei* + suco de maçã da variedade Fuji;

T4 - *Lactobacillus casei* + suco de maçã da variedade Gala;

T5 - *Lactobacillus acidophilus* + suco de maçã da variedade Fuji com pH 5,5;

T6 - *Lactobacillus acidophilus* + suco de maçã da variedade Gala com pH 5,5;

T7 – *Lactobacillus casei* + suco de maçã da variedade Fuji com pH 5,5;

T8 - *Lactobacillus casei* + suco de maçã da variedade Gala com pH 5,5;

T9 - *Lactobacillus casei* + suco de maçã da variedade Sansa.

4.2.4.1 Acompanhamento do crescimento celular em banho termostatzado

Para a avaliação da influência da matéria prima do inóculo no desenvolvimento da cultura probiótica no suco de maçã, três experimentos foram realizados. O microrganismo utilizado foi o *L. casei* e o suco de maçã Gala com pH original (4,0), o qual foi mantido constante durante as 20 horas de fermentação.

Os experimentos:

1 – Inóculo com LDR 10% + suco de maçã;

2 – Inóculo com caldo MRS + suco de maçã;

3 – Inóculo com suco de maçã Gala + suco de maçã.

Os três experimentos tiveram acompanhamento do pH, em banho termostatzado sob agitação, acoplado em potenciômetro a 37°C, de hora em hora até totalizar 20 horas.

Foram também analisados os números de células probióticas inicial e final (verificar item 4.2.5.1); determinadas às concentrações inicial e final de ácido málico e láctico; e ainda as concentrações inicial e final de açúcares redutores (verificar item 4.2.5.2).

4.2.5 Análises para o Acompanhamento do Crescimento Celular

4.2.5.1 Microbiológicas

Foram retiradas alíquotas de 1 mL das amostras, diluídas em água peptonada 0,1% e plaqueadas em profundidade em ágar MRS (Man-Rogosa-Sharpei, 1960) (Vetec Química Fina Ltda), nos tempos 0, 4, 8, 12, 16 e 20 horas.

4.2.5.2 Físico-químicas

Os açúcares redutores (AR) e totais (ART) foram quantificados pelo método de Somogy-Nelson sendo a glucose determinada pelo método enzimático colorimétrico da glucose oxidase (Gold Analisa Diagnóstica, Glicose – PP). A sacarose foi determinada por diferença entre os açúcares redutores totais e solúveis. A frutose calculada pela diferença entre os açúcares redutores solúveis e a glucose. Esta análise mais a acidez titulável (AT), o pH e a espectrometria foram determinados por métodos oficiais (ADOLFO LUTZ, 1985).

Para a análise de biomassa os tubos da centrífuga (Tecnal) foram identificados e secos. Os meios fermentados dos diferentes tratamentos foram centrifugados a 3.200 rpm, por 30 minutos, desprezando-se o sobrenadante, lavando-se duas vezes com 10 mL de água e intercalando-se com centrifugação.

Os concentrados obtidos foram secos à 60°C em estufa com circulação de ar, até peso constante e os resultados foram expressos em g/L (adaptação de GIRAUD et al., 1991).

O crescimento de *Lactobacillus casei*, em banho termostatzado, foi acompanhado pelo consumo de ácido málico e produção de ácido láctico, determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Estas análises foram realizadas nos laboratórios da EPAGRI-SC, em triplicata. O material utilizado consistiu em coluna C-18, fase móvel de solução de ácido sulfúrico (pH 2,4), vazão de 0,5 mL/min e leitura de 210 nm em UV.

4.2.5.3 Estatísticas

O delineamento foi de blocos incompletos, com 2 repetições dos tratamentos e análises em duplicatas para AT, pH e espectrometria, triplicatas para UFC/mL e AR. Foi utilizado o programa Estat 2.0, Microsoft Excel 97, Statistic e Origin 5.0 para a elaboração de gráficos, para a análise de variância e teste de Tukey. O experimento fatorial realizado foi de 6 x 2 x 2 x 2 (tempo (h) x bactéria (*L. casei* e *L. acidophilus*) x maçã (Gala e Fuji) x pH (original e 5,5)).

4.2.6 Acompanhamento da Viabilidade Celular

O volume de 40 mL de inóculo foi transferido para erlenmeyer, esterilizado, contendo 380 mL de suco pasteurizado de maçã, em pH original, incubado a 37° por 10 horas e em seguida mantido por 28 dias em geladeira a 8°C ± 0,5, as análises de viabilidade em duplicata foram realizadas de 7 em 7 dias (NIGHSWONGER, BRASHEARS e GILLILAND, 1996).

4.2.7 Análises Para o Acompanhamento da Viabilidade Celular por 28 Dias

4.2.7.1 Microbiológicas

Foram retiradas alíquotas de 1 mL das amostras, diluídas em água peptonada 0,1% e plaqueadas em profundidade em ágar MRS, de 7 em 7 dias, até completar 28 dias.

4.2.7.2 Físico-químicas

De 7 em 7 dias foram mensuradas a acidez titulável (AT) e o pH, seguindo os métodos oficiais (ADOLFO LUTZ, 1985).

4.2.8 Delineamento Experimental do Estudo da Otimização do Crescimento Celular de *Lactobacillus casei* em Suco de Maçã Gala e Fuji

Foi realizado o estudo da influencia do pH e tempo de incubação. Os experimentos foram concluídos com o auxílio de um planejamento experimental 2² fatorial. A matriz foi construída pelo programa Statistica® (TABELA 8).

TABELA 8 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO ESTUDO DA OTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR DE *Lactobacillus casei* EM SUCO DE MAÇÃ GALA E FUJI

X	Y
-1 = 0	-1 = 3,89
1 = 20	1 = 4,89

X = Tempo em horas

Y = pH

4.2.9 Análise Sensorial Descritiva Quantitativa

Foram utilizadas amostras de suco clarificado de maçã Gala: A – suco puro; B - fermentado probiótico no tempo de armazenamento de 0 dias; e, C - fermentado probiótico armazenado por 30 dias sob refrigeração à 8°C.

O método empregado para análise das amostras, a Análise Descritiva Quantitativa, compreende as etapas de seleção de provadores, levantamento da terminologia descritiva, treinamento e seleção final dos provadores e avaliação das amostras (STONE e SIDEL, 1993).

4.2.9.1 Pré-seleção de provadores

Na pré-seleção, o provador deve acertar 100% dos testes para identificação de gostos básicos (FIGURA 2). Foram aplicadas três repetições para cada provador. O acerto de 70% ou mais, foi exigido no teste de odores básicos (FIGURA 3) utilizando 15 substâncias aromáticas: fermento, cerveja, queijo, manteiga, maçã, vodka, vinagre, limão, canela, vinho, cravo, mel, camomila, café e chocolate. Para cada identificação correta do odor foi atribuída nota 3, se o termo era associativo, nota 2, termo errado, nota 1 e ausência de resposta, nota 0 (MEILGAARD, CIVILLE e CARR, 1999). Nesta etapa participaram 30 pessoas das quais 12 foram selecionadas.

FIGURA 2 – MODELO DE FICHA UTILIZADA NO TESTE DE GOSTOS BÁSICOS PARA A PRÉ-SELEÇÃO DE PROVADORES

RECONHECIMENTO DE GOSTOS BÁSICOS	
NOME: _____	DATA: __/__/__
<p>Prove, da esquerda para direita, cada uma das soluções. As soluções podem ter gosto doce, ácido, salgado ou amargo. Entre as soluções com gostos básicos pode haver uma ou mais amostras que tem apenas água e ainda ter repetições dos gostos básicos. Identifique o gosto da solução de cada um dos copinhos codificados. Enxagüar a boca com água antes de degustar e também entre uma amostra e outra.</p>	
CÓDIGO	GOSTO
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

FIGURA 3 – MODELO DE FICHA UTILIZADA NO TESTE DE RECONHECIMENTO DE ODORES BÁSICOS PARA A PRÉ-SELEÇÃO DE PROVADORES.

RECONHECIMENTO DE ODORES BÁSICOS	
NOME: _____	DATA: __/__/__
<p>Os frascos cobertos contêm substâncias odoríferas que se encontram em casa. Aproxime o frasco de seu nariz, tire a tampa, cheire 3 vezes brevemente e tente identificar o odor. Se não lhe vier à memória o nome exato da substância, tente descobrir alguma coisa com o qual você associe a esse odor.</p>	
CÓDIGO	ODOR
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

4.2.9.2 Levantamento de terminologia descritiva

O levantamento da terminologia (FIGURA 4) foi definido apresentando, aos pares, uma amostra de suco de maçã Fuji adicionado de 5% de leite em pó desnatado reconstituído 10%, outra amostra, de suco de maçã Fuji adicionado de 10% do inóculo com *Lactobacillus casei* e fermentado por 10 horas a 37°C.

As amostras permaneceram sob refrigeração, sendo retiradas 1 hora antes do teste, e apresentadas a temperatura de 15°C, aos 12 provadores, em copos plásticos brancos descartáveis de 50 mL, codificadas com números de 3 dígitos.

Após cada provador ter criado seus próprios termos foi realizada uma discussão em grupo sob a supervisão de um moderador com o objetivo de agrupar termos semelhantes e eliminar aqueles que não eram percebidos pela maioria dos provadores; e assim a ficha de termos e suas definições foram elaboradas (QUADRO 2, item 5.5). Foram considerados os descritores que apareceram maior número de vezes foram eliminados os termos sinônimos ou redundantes e ainda aqueles que apareceram com frequência baixa (STONE e SIDEL, 1993).

FIGURA 4 – MODELO DE FICHA UTILIZADA PARA O LEVANTAMENTO DA TERMINOLOGIA DESCRITIVA

<p style="text-align: center;">FICHA PARA LEVANTAMENTO DE TERMINOLOGIA DESCRITIVA</p> <p>NOME: _____ DATA: __/__/__</p> <p>Por favor, prove as duas amostras quanto à aparência, aroma, gosto e textura e indique em que elas são similares e em que são diferentes.</p> <p style="text-align: center;">Amostras: _____ e _____</p> <p>Aparência:</p> <p>Aroma:</p> <p>Gosto:</p> <p>Textura:</p>
--

Na ficha elaborada foi utilizada uma escala linear não estruturada de 9 cm, ancorada nas suas extremidades com termos que expressam intensidade (FIGURA 5).

FIGURA 5 – MODELO DE FICHA UTILIZADA PARA SELEÇÃO FINAL E AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS

Ficha de Avaliação – Seleção Final		
NOME: _____	DATA: __/__/__	
Por favor, avalie a intensidade de cada característica utilizando a escala correspondente.		
Amostra: _____		
APARÊNCIA		
Cor caramelo	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="flex: 1; border-bottom: 1px solid black; position: relative;"> <div style="position: absolute; left: 0; top: -5px; width: 5px; height: 10px; border-left: 1px solid black;"></div> <div style="position: absolute; right: 0; top: -5px; width: 5px; height: 10px; border-right: 1px solid black;"></div> </div> </div>	Fraco
		intenso
AROMA		
Maçã	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="flex: 1; border-bottom: 1px solid black; position: relative;"> <div style="position: absolute; left: 0; top: -5px; width: 5px; height: 10px; border-left: 1px solid black;"></div> <div style="position: absolute; right: 0; top: -5px; width: 5px; height: 10px; border-right: 1px solid black;"></div> </div> </div>	Ausente
		muito
GOSTO		
Ácido	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="flex: 1; border-bottom: 1px solid black; position: relative;"> <div style="position: absolute; left: 0; top: -5px; width: 5px; height: 10px; border-left: 1px solid black;"></div> <div style="position: absolute; right: 0; top: -5px; width: 5px; height: 10px; border-right: 1px solid black;"></div> </div> </div>	Ausente
		muito
Maçã	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="flex: 1; border-bottom: 1px solid black; position: relative;"> <div style="position: absolute; left: 0; top: -5px; width: 5px; height: 10px; border-left: 1px solid black;"></div> <div style="position: absolute; right: 0; top: -5px; width: 5px; height: 10px; border-right: 1px solid black;"></div> </div> </div>	Ausente
		muito
Doce	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="flex: 1; border-bottom: 1px solid black; position: relative;"> <div style="position: absolute; left: 0; top: -5px; width: 5px; height: 10px; border-left: 1px solid black;"></div> <div style="position: absolute; right: 0; top: -5px; width: 5px; height: 10px; border-right: 1px solid black;"></div> </div> </div>	Ausente
		muito
TEXTURA		
Encorpada	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="flex: 1; border-bottom: 1px solid black; position: relative;"> <div style="position: absolute; left: 0; top: -5px; width: 5px; height: 10px; border-left: 1px solid black;"></div> <div style="position: absolute; right: 0; top: -5px; width: 5px; height: 10px; border-right: 1px solid black;"></div> </div> </div>	Ausente
		muito

4.2.9.3 Treinamento dos provadores

A equipe de provadores foi reunida em dez sessões de treinamento onde foram apresentadas amostras de referências com seus respectivos extremos de escala para cada um dos atributos selecionados (QUADRO 2, item 5.5).

4.2.9.4 Seleção final

Foram realizadas 3 sessões com a apresentação individual e aleatória, em cada uma delas, de 3 amostras de suco de maçã, adicionadas de 5% e 10% de leite em pó desnatado reconstituído e outra fermentada com *Lactobacillus casei* por 10 horas, separadamente. O delineamento experimental foi de blocos completos casualizados com 3 repetições. Os provadores utilizaram a própria Ficha de Avaliação desenvolvida na etapa anterior (FIGURA 5), sendo-lhes permitido consultar, a qualquer momento da sua análise, a lista de definições e as referências.

Com os resultados obtidos foi procedida a análise de variância (ANOVA) para cada provador, em cada um dos atributos, utilizando o programa estatístico “Statistical Analysis System”, versão 6.12 (SAS). Foram selecionados, para compor a equipe descritiva final, aqueles provadores que apresentaram bom poder discriminativo ($p_{amostra} < 0,50$), consenso com os demais membros do grupo e boa reprodutibilidade nos julgamentos ($p_{repetição} > 0,50$).

4.2.9.5 Avaliação das amostras

Doze provadores selecionados avaliaram as 3 amostras, de acordo com os atributos que foram definidos como mais característicos. Esta etapa foi realizada em 3 sessões, com as amostras sendo apresentadas separadamente, em ordem inteiramente casualizada.

As amostras foram preparadas previamente, de forma que todos os tratamentos (A – suco clarificado de maçã Gala; B – suco fermentado de maçã Gala com *Lactobacillus casei*, com tempo de armazenamento de 0 dias; C - suco fermentado de maçã Gala, com *Lactobacillus casei*, no tempo de armazenamento de 30 dias) pudessem ser analisados no mesmo dia. As amostras foram servidas em copos descartáveis de 50 mL, à 15°C.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com 3 fatores de variação: amostra, provador e interação amostra*provador, para cada um dos atributos sensoriais levantados, e considerado o nível de significância $p < 0,05$. Na sequência foi utilizado o teste de Tukey, a partir dos dados da ANOVA, para

comparação entre as médias ($p < 0,05$) e análise de componentes principais (ACP). Essas análises foram realizadas no programa estatístico SAS.

4.2.10 Análise Sensorial de Aceitação

4.2.10.1 Formulações

Para a análise de aceitação do suco fermentado foram utilizadas como amostras as seguintes formulações F1 – o suco de maçã Gala fermentado em 10 horas, com inóculo de *Lactobacillus casei*; F2 – F1 + 2% de sacarose; F3 – F1 + 1% de amido modificado.

4.2.10.2 Análises

Com 177 provadores, não treinados, com faixa etária de 7 a 65 anos, utilizando a escala hedônica de 5 pontos (FIGURA 6), foi realizada a análise de aceitação sensorial das formulações.

Os provadores foram distribuídos em 3 grupos com 61, 57 e 59 pessoas, para as formulações com açúcar, amido e puro, respectivamente, de modo que cada grupo correspondesse a uma única formulação (SHIROSE e MORI, 1994).

Para a análise dos dados foi utilizado o teste de Goodman, de estatística não-paramétrica (SHIROSE e MORI, 1994) e os gráficos foram elaborados no programa Microsoft Excell 97.

FIGURA 6 – MODELO DE FICHA UTILIZADA PARA ANÁLISE SENSORIAL DE ACEITAÇÃO, PARA AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DO PRODUTO FINAL

FICHA PARA ANÁLISE SENSORIAL DE ACEITAÇÃO		
Nome: _____ Data: _____ Idade: _____		
Avalie a amostra de suco de maçã fermentado com <i>Lactobacillus</i> sp, codificada e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou de cada amostra.		
1 – Gostei muito		
2 – Gostei ligeiramente		
3 – Indiferente		
4 – Desgostei ligeiramente		
5 – Desgostei muito		
	Amostra	Valor
	_____	_____
Comentários: _____		

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizada a caracterização físico-química da matéria-prima, assim como a caracterização físico-química e microbiológica dos inóculos e a avaliação do crescimento de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus* em suco de maçã clarificado das variedades Fuji e Gala e a viabilidade do *Lactobacillus casei* em suco de maçã Gala, por 28 dias.

São discutidos também os resultados de testes complementares do crescimento de *Lactobacillus casei* em suco de maçã Sansa e, de sua multiplicação com inóculos de caldo MRS, LDR 10% e em suco de maçã Gala no banho termostatizado sob agitação em suco de maçã Gala, sob a temperatura de 37°C por 20 horas.

O produto final da fermentação do *Lactobacillus casei* em suco de maçã Gala foi caracterizado e avaliada a sua aceitação sensorial.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

Os sucos despectinizados das variedades de maçãs foram caracterizados pelos parâmetros físico-químicos, que estão apresentados na TABELA 9.

TABELA 9 – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS SUCOS DE MAÇÃ DAS VARIEDADES GALA, FUJI E SANSÁ

Variedade	° Brix	Parâmetros Físico-químicos						pH
		ART g/100mL	Sacarose g/100 mL	Glucose g/100 mL	Frutose g/100 mL	Acidez mL solução normal 100mL de amostra	Acidez g/100mL de ác. málico	
Fuji	14,25	12,90	1,02	2,81	9,07	0,39	0,26	4,01
Gala	12,75	12,54	1,81	2,28	8,45	0,35	0,23	4,00
Sansa	15,00	13,29	0,87	3,10	9,32	0,48	0,32	3,87

O suco da variedade Sansa apresentou o valor mais elevado de sólidos solúveis, de 15,00° Brix e o da Gala menor valor 12,75° Brix. Com relação aos valores de açúcares redutores totais, a ordenação foi a mesma com valores um pouco inferiores. As análises dos açúcares solúveis apresentaram valores em porcentagem de frutose semelhantes para os três sucos, cerca de 69%. Este dado é

semelhante ao encontrado na literatura, que quantifica a frutose em 70% da fração solúvel de carboidratos do suco de maçã (WOSIACKI, PHOLMANN e NOGUEIRA, 2004).

A acidez total titulável expressa em mL de solução normal por 100mL de amostra, apresentou valor médio de 0,41 e em ácido málico com média de 0,27 em g/100mL. Este parâmetro está apresentado em duas unidades devido ao fato de que nos produtos fermentados haverá não somente ácido málico, mas também ácido láctico, portanto nas próximas tabelas apresentar-se-á apenas a unidade em mL de solução normal por cento.

Segundo Goularte, Antunes e Antunes (2000) é possível encontrar na literatura valores diferentes da composição de sólidos solúveis dos sucos de maçã, pois estão relacionados ao estágio de maturação, safra e local de produção das maçãs, como pode ser visto a seguir (Tabelas 10 e 11) com os dados do Grupo da Tecnologia da Maçã⁴² (GTM).

TABELA 10 – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE SUCO DE MAÇÃ DA VARIEDADE GALA PRODUZIDA EM SANTA CATARINA

SAFRA	Acidez Titulável g/100mL de ac. málico	ART g/100 mL	° Brix
1994-1995	0,161	10,62	10,4
2001-2002	0,287	12,86	12,0

TABELA 11 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE SUCO DE MAÇÃ DA VARIEDADE GALA PRODUZIDA NA SAFRA 2001-2002

LOCAL	Acidez Titulável g/100mL de ac. málico	ART g/100 mL	° Brix
Santa Catarina	0,287	12,86	12,0
Rio Grande do Sul	0,32	10,01	-

O suco de maçã utilizado por Shukla, Sharma e Singh (2003) apresentou características físico-químicas semelhantes às do suco de maçã da variedade Gala apresentada na tabela 10, com exceção do pH que foi mais elevado. As características do suco do trabalho referido foram: sólidos totais, 11,7g/100mL; °Brix,

⁴² GTM – Grupo da Tecnologia da Maçã. Arquivos de dados localizados no Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Site: www.uepg.br/gtm.

11,27; acidez titulável, 0,33g/100mL; ART, 10,14 g/mL; e pH = 4,13. Os autores utilizaram este suco para a combinação com diferentes concentrações de suco de frutas ou polpa de frutas (100, 200, 300 e 400 g/L) em leite desnatado reconstituído a 10%.

A caracterização dos inóculos com *L. casei* é apresentada na tabela 12.

TABELA 12 – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS INÓCULOS DE *Lactobacillus casei* EM LEITE DESNATADO RECONSTITUÍDO (LDR 10%), SUCO DE MAÇÃ GALA E CALDO MRS

Inóculo	° Brix	Parâmetros Físico-químicos					pH
		ART g/100 mL	Sacarose g/100 mL	Glucose g/100 mL	Frutose g/100 mL	Acidez mL de solução normal 100mL de amostra	
LDR	6,25	1,15	0,08	-	-	1,59	3,61
Suco	13,00	12,12	1,21	2,80	8,11	0,43	3,35
MRS	5,00	0,44	-	0,21	-	2,36	3,35

Em testes complementares foi verificada a viabilidade do uso do suco e do caldo MRS como inóculo, pois, o sistema de processamento das bactérias para alimentos funcionais é dependente da composição e processamento da matéria-prima utilizada como substrato, enquanto que a viabilidade destas bactérias e sua produtividade são dependentes do processamento e das condições de armazenamento do produto final (KNORR, 1998).

Para avaliar o crescimento das bactérias lácticas torna-se necessário conhecer as concentrações dos substratos do meio de crescimento, as condições de temperatura e o valor de pH, pois são os fatores de maior influência no seu desenvolvimento (BÉAL et al.⁴³ *apud* OLIVEIRA e DAMIN, 2003; e ZOURARI, ACCOLAS e DESMAZEAUD⁴⁴ *apud* OLIVEIRA e DAMIN, 2003). Tanto os meios utilizados para a produção do inóculo quanto os sucos para fermentação, apresentam açúcares fermentescíveis por bactérias lácticas (SALMINEN e VON WRIGHT, 1993). O leite desnatado reconstituído contém lactose, os sucos, glucose, frutose e sacarose, e o caldo MRS, glucose. Os valores de acidez titulável dos sucos

⁴³ BÉAL, C. et al. Cinétiques de croissance et d'acidification des bactéries lactiques. In: Roissart, H., Luquet, F.M., eds. **Bactéries Lactiques**, Loriga : Chemin de Saint Georges, v. 1, p. 367-401, 1994.

⁴⁴ ZOURARI, A.; ACCOLAS, J.P.; DESMAZEAUD, M.J. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. **Le lait**, v. 72, p. 1-34, 1992.

das maçãs Gala e Fuji e Sansa estão nos limites definidos por Gomes e Malcata (1999), de 0,3 a 1,9 mL de solução normal %, para o crescimento dos *Lactobacillus*.

Como requisito para que um microrganismo possa ser probiótico considera-se a tolerância a baixos valores de pH, garantindo sua sobrevivência pela passagem no trato gastrointestinal. Segundo Naidu, Bidlack e Clemens⁴⁵ citados por Cats et al. (2003) as espécies de lactobacilos têm habilidade de adesão à parede estomacal e de crescimento sob condições ácidas. Na literatura pode ser encontrado que o pH ideal de crescimento para as bactérias lácticas é de 5,5 a 6,0 (GOMES e MALCATA, 1999) e por este fato são utilizados meios de pH básico para o crescimento destas bactérias, como o leite para a produção de iogurte (LOPEZ et al, 1998) e queijo (GARDINER et al, 1999). Assim, estes substratos asseguram o desenvolvimento dos microrganismos pelo consumo da lactose durante a fermentação e após, garantem a manutenção celular pelo tempo de prateleira pré-estabelecido.

A escolha do leite desnatado reconstituído a 10% como inóculo foi devida à viabilidade celular bacteriana que proporciona em meio ácido. Esta característica foi observada na pesquisa de Fernández, Boris e Barbés (2003) sobre as propriedades das espécies de *Lactobacillus* do trato gastrointestinal humano, quando verificaram que a presença do leite desnatado em meio ácido (pH 2 e 3), estimulou a sobrevivência de todas as espécies em estudo, inclusive do *Lactobacillus acidophilus*. Há, também, indícios da relação entre a sobrevivência de *Lactobacillus* no suco gástrico e o aumento da adesão intestinal em células *in vitro* o que favorece a efetividade do produto (CONWAY, GORBACH e GOLDIN⁴⁶ *apud* CATS et al., 2003).

Vinderola et al. (2000) observaram a manutenção de células de microrganismos probióticos em queijos acidificados a pH 2 e 3 mantidos a 37°C por 3 horas. Os *Lactobacillus casei* apresentaram morte celular de 5 ciclos log em pH 2 e maior estabilidade em pH 3 com um decréscimo de 1 ciclo log, demonstrando-se ácido-resistentes.

⁴⁵ NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R. e CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews of Food Science Nutrition**, v. 38, p. 13-26, 1999.

⁴⁶ CONWAY, P. L.; GORBACH, S. L. e GOLDIN, B. R. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adesion to intestinal cells. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 1-20, 1987.

Além destes fatos, os microrganismos são inoculados em leite desnatado reconstituído a 10% e transferidos em 10% do volume do meio a ser fermentado nos procedimentos tradicionais de produção de bebidas probióticas (GARDINER et al., 1998).

As bebidas à base de frutas e produtos lácteos têm tido potencial de crescimento no mercado porque, além de terem características agradáveis ao paladar, são altamente nutritivas (SHUKLA, SHARMA e SINGH, 2003) e a sobrevivência do microrganismo probiótico tem sido ideal durante a vida de prateleira dos produtos (SAXELIN et al., 1999).

5.2 CRESCIMENTO CELULAR DE *Lactobacillus casei* E *Lactobacillus acidophilus*

Os sucos de maçã das variedades Fuji e Gala foram avaliados quanto ao desenvolvimento das culturas inoculadas de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) e *Lactobacillus casei* (Lcc). As médias dos resultados das análises físico-químicas durante 20 horas de fermentação são apresentadas nas tabelas 13 e 14.

TABELA 13 - MÉDIAS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS TRATAMENTOS COM pH ORIGINAL

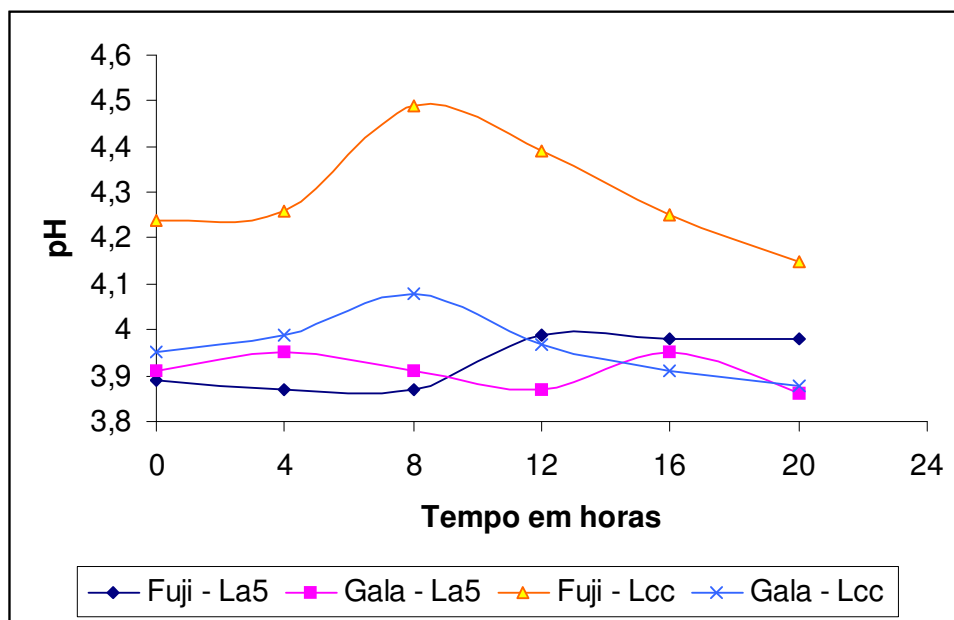
ANÁLISES	TRATAMENTOS			
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>		<i>Lactobacillus casei</i>	
	Fuji	Gala	Fuji	Gala
pH	3,93c	3,91c	4,30a	3,96b
AT mL solução normal 100mL de amostra	0,440c	0,469a	0,285d	0,355b
AR g/100mL	10,89a	9,77b	10,78a	9,00c
Biomassa g/L	4,99a	3,95b	5,87a	3,49b

Médias seguidas de mesmas letras, em cada linha, não diferem significativamente ao erro de 5% pelo teste de Tukey

Houve diferença significativa na evolução do pH entre os sucos de maçãs e na contagem de células, sendo a maior média obtida por *Lactobacillus casei*. A evolução do pH proporcionada por este microrganismo foi significativa a 5% e a proporcionada por *Lactobacillus acidophilus* foi constante, não diferindo significativamente no decorrer do tempo (FIGURA 7). O comportamento do *Lactobacillus casei* diferiu significativamente do *Lactobacillus acidophilus* obtendo maior média de pH em suco de maçã Fuji. Nos experimentos com a maçã Gala, o *Lactobacillus casei* diferiu do *Lactobacillus acidophilus*, apresentando menor

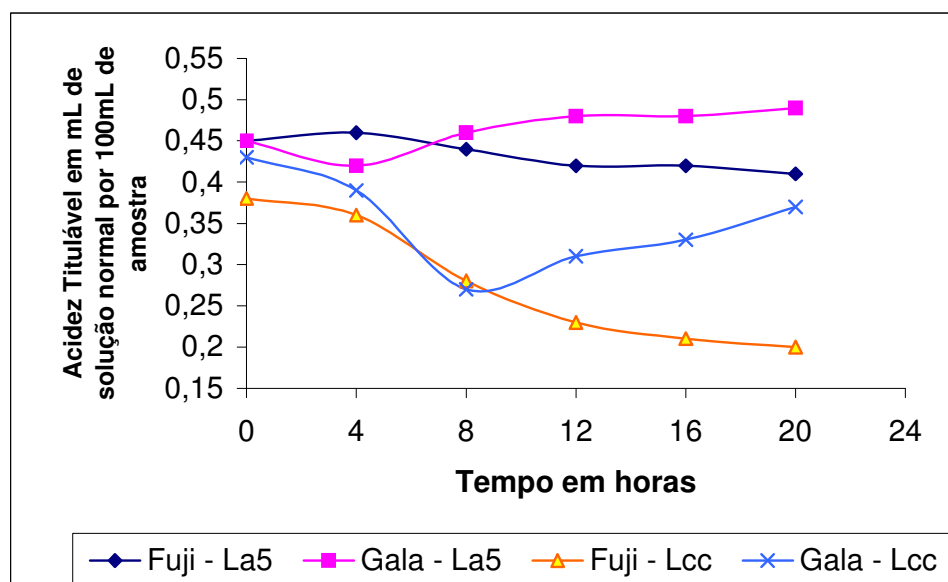
acidificação. As variedades de maçã não influenciaram o crescimento do *Lactobacillus acidophilus*. Entre os sucos varietais, o *Lactobacillus casei* proporcionou maior acidificação no produto obtido a partir do suco de maçã da variedade Gala (TABELA 13 e FIGURA 8).

FIGURA 7 – EVOLUÇÃO DO pH EM SUCO DE MAÇÃ DAS VARIEDADES FUJI E GALA, DURANTE A FERMENTAÇÃO LÁTICA COM *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*



Após as 12 horas de fermentação houve diferença na produção da acidez titulável entre as variedades de maçãs a 1% e entre as bactérias a 5% que ocorreu (FIGURA 8). A maçã Gala apresentou maior média e o *Lactobacillus acidophilus* maior produção de acidez titulável durante a fermentação de 20h. Tanto o *Lactobacillus acidophilus* quanto o *Lactobacillus casei* apresentaram maior acidificação no suco de maçã Gala (TABELA 13).

FIGURA 8 – EVOLUÇÃO DA ACIDEZ EM SUCO DE MAÇÃ DAS VARIEDADES FUJI E GALA, DURANTE A FERMENTAÇÃO LÁTICA COM *Lactobacillus acidophilus* E *Lactobacillus casei*



Houve diferença significativa entre a média de açúcares redutores entre as maçãs e no consumo de açúcares pelo *Lactobacillus acidophilus* e pelo *Lactobacillus casei*, sendo o suco de maçã Gala com *Lactobacillus casei* com menor média de açúcares redutores.

Em relação à média de biomassa do processo fermentativo de 20 horas, houve diferença entre as variedades de maçã, sendo que o suco da variedade Fuji obteve maior média de biomassa, devido ao maior conteúdo de sólidos no suco desta variedade, porém, não houve diferença na média de biomassa resultante dos microrganismos.

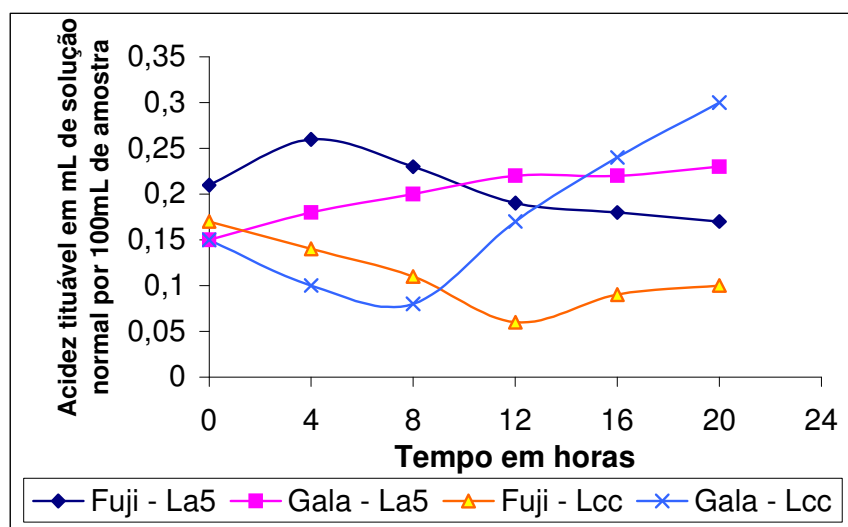
TABELA 14 - MÉDIAS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS TRATAMENTOS COM SUCOS COM pH 5,5

ANÁLISES	TRATAMENTOS			
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>		<i>Lactobacillus casei</i>	
	Fuji	Gala	Fuji	Gala
pH	4,85c	4,93c	5,63a	5,12b
AT mL solução normal 100mL de amostra	0,219a	0,204a	0,114c	0,178b
AR g/100mL	10,84a	9,15b	10,78a	9,00b
Biomassa g/L	3,46a	3,71a	3,32a	3,67a

Médias seguidas de mesmas letras, em cada linha, não diferem significativamente ao erro de 5% pelo teste de Tukey

Houve diferença significativa a 5% na produção de acidez titulável pelas bactérias e entre as variedades de maçãs, nos tratamentos onde o pH do meio foi modificado para 5,5. No produto obtido com o *Lactobacillus acidophilus* verificou-se a maior média de acidez titulável ao longo de 20 horas de fermentação. No tempo 0 já havia diferença significativa na acidez entre as maçãs, o suco da maçã Fuji manteve maior média de acidez até as 12 horas de fermentação, situação que foi invertida após este tempo (FIGURA 9). Na produção da acidez titulável houve diferença a 5%, de 4 a 20 horas, proporcionada pelas bactérias, não diferindo no tempo 0. Os tratamentos com *Lactobacillus acidophilus* não apresentam diferença quanto à produção de acidez em função da variedade de maçã, porém é significativamente maior em Fuji que o *Lactobacillus casei*. Este último apresentou média significativamente maior em suco de maçã Gala (TABELA 14 e FIGURA 9).

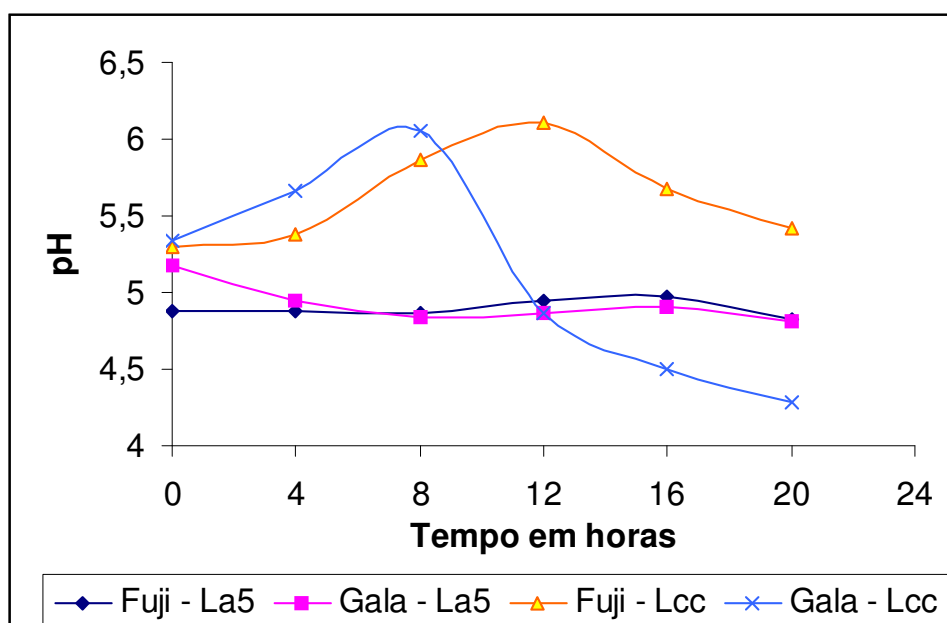
FIGURA 9 – EVOLUÇÃO DA ACIDEZ EM SUCO DE MAÇÃ DAS VARIEDADES FUJI E GALA, DURANTE A FERMENTAÇÃO LÁTICA COM *Lactobacillus acidophilus* E *Lactobacillus casei* COM pH MODIFICADO PARA 5,5



Houve diferença significativa de 5% na evolução do pH, entre os tratamentos durante a fermentação (FIGURA 10). O suco de maçã Fuji apresentou menor média de pH. A partir de 12 horas, o suco de maçã Gala apresentou maior acidificação que o suco de maçã Fuji. Inicialmente o *Lactobacillus casei* apresentou maior pH e após 16 horas não houve diferença na evolução do pH entre os microrganismos. O *Lactobacillus acidophilus* não obteve diferença de pH entre os sucos varietais.

Houve diferença, a 5%, na evolução do pH por *Lactobacillus casei* com maior média em Fuji (TABELA 14).

FIGURA 10 – EVOLUÇÃO DO pH EM SUCO DE MAÇÃ DAS VARIEDADES FUJI E GALA, DURANTE A FERMENTAÇÃO LÁTICA COM *Lactobacillus acidophilus* E *Lactobacillus casei* EM pH MODIFICADO PARA 5,5



Em relação aos açúcares redutores dos fermentados com modificações no pH foi constatada diferença somente entre as maçãs, sendo o suco da Gala que apresentou menor média de sólidos solúveis.

Os sucos da variedade Fuji, fermentados sem alteração no pH, obtiveram maior média de biomassa e, a produção de biomassa entre os tratamentos com a variedade Gala foi similar. Estes fatos devem-se a maior concentração de sólidos solúveis do suco da maçã Fuji.

As alterações físico-químicas proporcionadas pelos microrganismos, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*, ao longo de 20 horas, nas análises de pH e acidez titulável são semelhantes entre as variedades de maçãs (FIGURAS 7 a 10), porém apresentam as diferenças estatísticas quando comparadas juntamente com os microrganismos (TABELAS 13 e 14).

Normalmente as bactérias lácticas (LAB) consomem os açúcares disponíveis no meio e produzem ácido lático promovendo aumento da acidez e conseqüente

redução do pH. Porém, nos experimentos realizados, foi constatada uma diminuição da acidez, em especial, nos tratamentos com *Lactobacillus casei* em maçã Fuji e Gala (FIGURAS 8 e 9).

Segundo Rizon e Miele (2002), Garcerá et al. (1993) e Salminen e Wright (1993), o aumento da acidez durante a fermentação com bactérias láticas ocorre devido ao metabolismo bacteriano em meio rico em ácido málico, pela transformação em ácido lático e CO₂ ou pela degradação do ácido pela enzima málica, que tem como produtos finais o D- e o L-lactato e CO₂. Essa conversão do ácido málico foi observada por Schütz e Radler⁴⁷ em *Lactobacillus casei* citado por Garcerá et al. (1992).

Quando foram analisadas as concentrações de ácido lático e ácido málico, inicial e final da fermentação dos *Lactobacillus casei* no suco fermentado de maçã Gala, foi verificado que houve uma produção de 31% de ácido lático e a redução de ácido málico em 87% (Tabela 15), foi verificada também a veracidade da produção de gás. Isso explica o aumento da acidez e a redução do pH ao longo das 20 horas de fermentação e conferindo as informações da literatura (VARNAM e SUTHERLAND, 1999).

TABELA 15 – CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO MÁLICO E LÁTICO EM SUCO DE MAÇÃ GALA, INOCULADO COM *Lactobacillus casei* EM LDR 10%, FERMENTADO POR 20 HORAS

Ácido	Concentração em mg.L ⁻¹	
	Inicial	Final
Lático	2.977	4.335
Málico	3.116	393

Os experimento com os sucos de maçã das variedades Fuji e Gala, ao serem fermentados, apresentaram crescimento celular satisfatório para um produto probiótico, principalmente de *Lactobacillus casei* (FIGURAS 11 e 12 e TABELA 16).

⁴⁷ SCHÜTZ, M. e RADLER, F. Das vorkommen von malatenzym and malo-lactct-enzym bei verschiedenen milchäurebakterien. **Achiev Mikrobiology**, v. 96, p. 329, 1974.

FIGURA 11 – EVOLUÇÃO DE UFC/mL DE CÉLULAS DE *Lactobacillus casei* E *Lactobacillus acidophilus*, EM SUCO DE MAÇÃ DAS VARIEDADES FUJI E GALA COM pH ORIGINAL, DURANTE A FERMENTAÇÃO LÁTICA

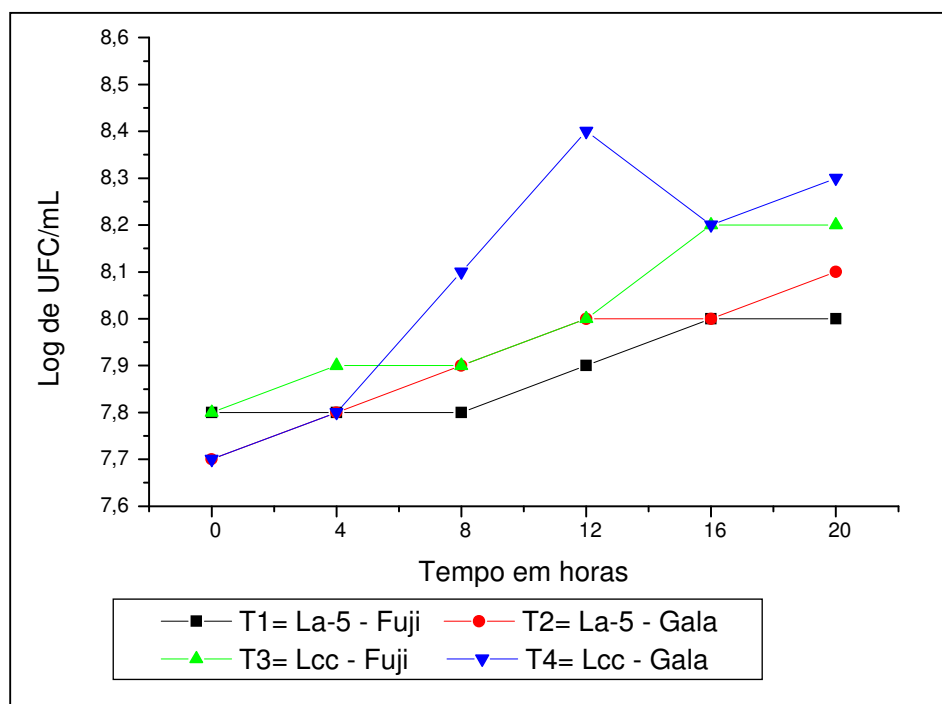
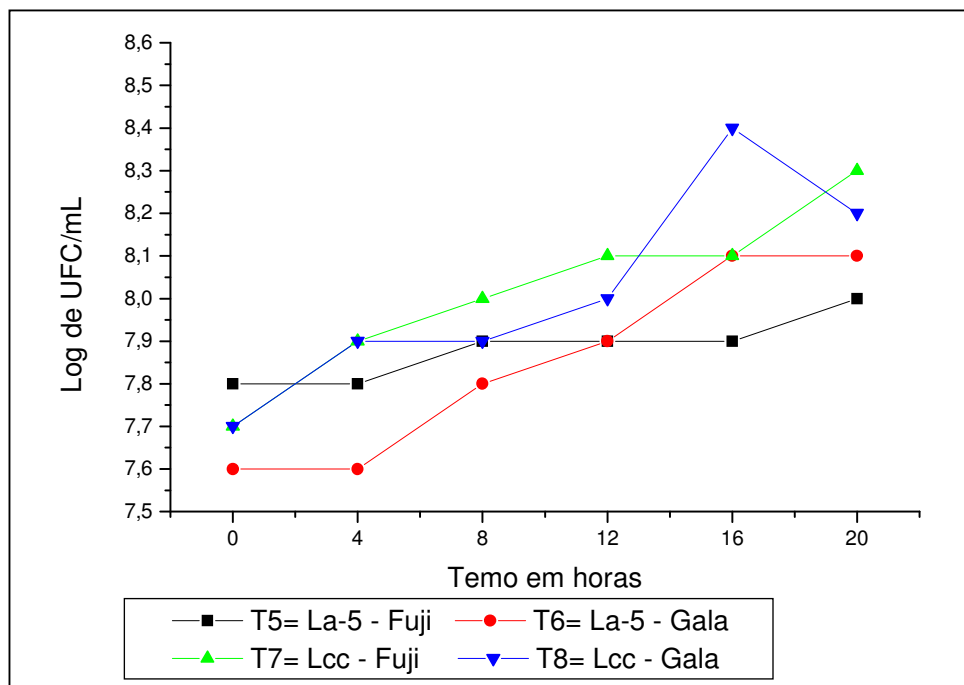


FIGURA 12 – EVOLUÇÃO DE UFC/mL DE CÉLULAS DE *Lactobacillus casei* E *Lactobacillus acidophilus*, EM SUCO DE MAÇÃ DAS VARIEDADES FUJI E GALA COM pH 5,5, DURANTE A FERMENTAÇÃO LÁTICA



Os *Lactobacillus acidophilus* apresentaram crescimento máximo de 0,5 ciclos Log em maçã Gala e pH do meio modificado para 5,5 (FIGURA 12) e o *Lactobacillus casei* obteve 0,7 ciclos Log de crescimento em suco de maçã Gala (TABELA 16).

TABELA 16 – LOG DE UFC/mL DE *Lactobacillus acidophilus* E *Lactobacillus casei* NA FERMENTAÇÃO DE 20 HORAS DO SUCO DE MAÇÃ

Log de UFC/mL								
Sem modificação do pH do meio					Com modificação do pH do meio para 5,5			
Tempo	La-5		Lcc		La-5		Lcc	
	Fuji	Gala	Fuji	Gala	Fuji	Gala	Fuji	Gala
0	7,8	7,7	7,8	7,7	7,8	7,6	7,7	7,7
4	7,8	7,8	7,9	7,8	7,8	7,6	7,9	7,9
8	7,8	7,9	7,9	8,1	7,9	7,8	8,0	7,9
12	7,9	8,0	8,0	8,4	7,9	7,9	8,1	8,0
16	8,0	8,0	8,2	8,2	7,9	8,1	8,1	8,4
20	8,0	8,1	8,2	8,3	8,0	8,1	8,3	8,2

No experimento de Mozzi et al. (2001) foi observado que não houve diferença no crescimento do *Lactobacillus casei* CRL 87 em glucose e galactose durante a incubação por 24 horas a 30°C. Porém, a fase logarítmica ocorreu em menor tempo em meio com a glucose como fonte de carbono. Na fermentação neste experimento com o *Lactobacillus casei*, esta fase logarítmica em menor tempo ocorreu no suco de maçã Gala sem modificações no pH.

Dentre todos os tratamentos, o *Lactobacillus casei* apresentou maior crescimento celular, com média de 8,12 ciclos Log e confirmada pelas análises de espectrometria, no suco de maçã de variedade Gala (TABELAS 17 e 18).

TABELA 17 – VARIAÇÃO DA TRANSMITÂNCIA EM FUNÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR (620 nm), DOS TRATAMENTOS EM SUCO DE MAÇÃS DAS VARIEDADES FUJI E GALA COM pH ORIGINAL, DURANTE A FERMENTAÇÃO LÁTICA

TEMPO	TRATAMENTOS			
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>		<i>Lactobacillus casei</i>	
	Fuji	Gala	Fuji	Gala
0	37,1	98,5	32,2	84,75
4	75,07	87	59,9	79,2
8	71,85	78,97	71,3	76,65
12	100	87,1	65,5	103,8
16	96,97	81,1	64	102,45
20	96,22	78,8	65,5	107,2

TABELA 18 – VARIAÇÃO DA TRANSMITÂNCIA EM FUNÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR (620 nm), EM SUCO FERMENTADO DE MAÇÃS DAS VARIEDADES FUJI E GALA COM pH DO MEIO AJUSTADO EM 5,5, DURANTE A FERMENTAÇÃO LÁTICA

TEMPO	TRATAMENTOS			
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>		<i>Lactobacillus casei</i>	
	Fuji	Gala	Fuji	Gala
0	28,8	82,8	36,4	90,75
4	72,75	89,4	55,85	79,5
8	71,47	88,13	96	78,75
12	100,05	97,86	17,55	65,25
16	131,1	95,06	16,2	63
20	91,72	92,8	12,4	77,2

O crescimento celular do *Lactobacillus casei* em suco de maçã Gala (FIGURA 11) foi de 0,7 ciclos log a 37°C, apresentando-se semelhante ao experimento de Choi et al. (1996) que observou o aumento de 1 ciclo log de Lcc em soro de leite desnatado, com pH 6,2, sólidos totais de 5,2%, e 4% de lactose, adicionado 40g/L de LDR, 15,6 g/L de extrato de levedura, 0,102 g/L de MnSO₄, 0,02 g/L de bactopectona e 0,01 g/L de MgSO₄, dissolvidos em 1 litro de soro, este meio foi inoculado com 2% de Lcc a 30°C por 24 horas. Em meio MRS, nas mesmas condições que o soro de leite desnatado, Choi et al. (1996) obteve crescimento de 0,8 ciclos log de Lcc.

Mozzi et al. (2001), avaliando a produção de polissacarídeos por *Lactobacillus casei*, em dois meios para síntese de exopolissacarídeos, com galactose ou glucose como fonte de carbono, a 30°C por 24 horas de incubação e com crescimento celular aproximado de 1,7 ciclos log, determinaram que os diferentes carboidratos não interferem no crescimento deste microrganismo. Segundo Saxelin et al. (1999), a sobrevivência e o número de células das bactérias probióticas dependem das espécies e da tecnologia utilizada.

As análises de espectrometria indicaram que as maiores médias de crescimento celular de *Lactobacillus casei* entre os tratamentos sem modificação do pH foi com suco de maçã Gala. O crescimento dos microrganismos, nos sucos das maçãs Gala e Fuji, foram diferentes, uma vez que o ponto máximo de crescimento ocorreu após 12 horas em suco de maçã Gala, sem alteração no pH.

A evolução do consumo dos açúcares redutores pode ser observada nas figuras 13 e 14.

FIGURA 13 – EVOLUÇÃO DO CONSUMO DE AÇÚCARES REDUTORES POR *Lactobacillus casei* E *Lactobacillus acidophilus*, EM SUCO DE MAÇÃ DAS VARIEDADES FUJI E GALA DURANTE A FERMENTAÇÃO LÁTICA

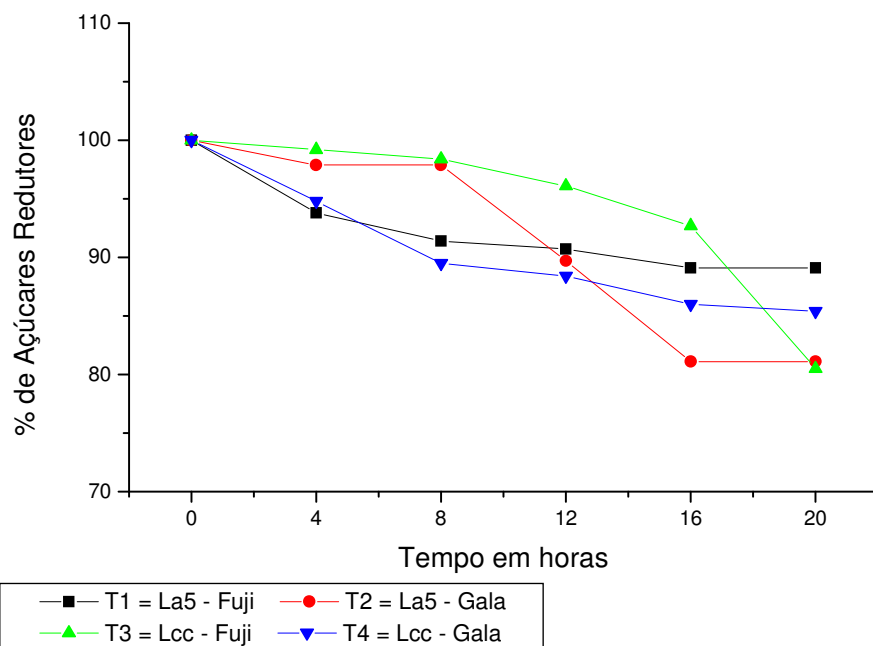
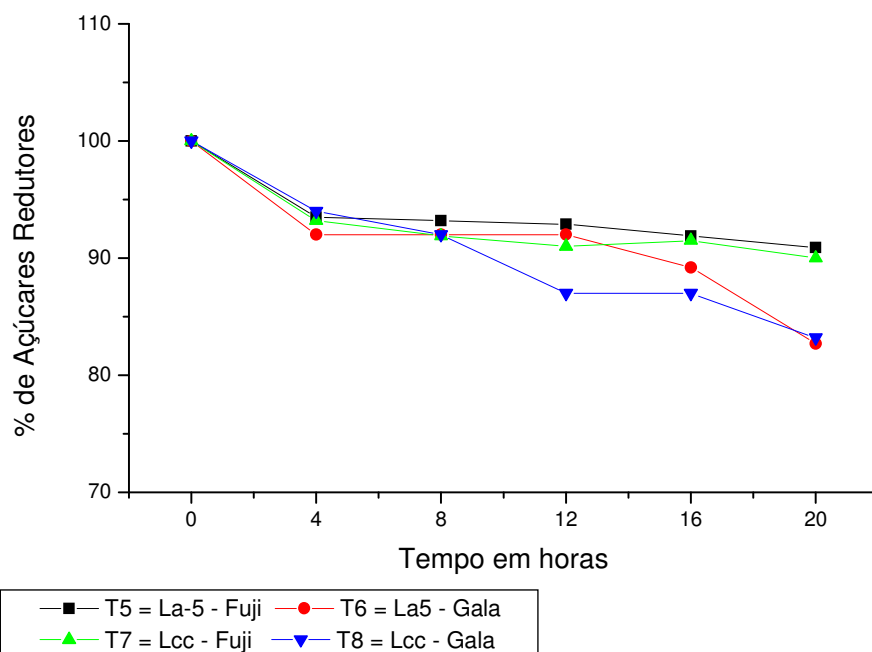


FIGURA 14 – EVOLUÇÃO DO CONSUMO DE AÇÚCARES REDUTORES POR *Lactobacillus casei* E *Lactobacillus acidophilus*, EM SUCO DE MAÇÃ DAS VARIEDADES FUJI E GALA COM pH 5,5, DURANTE A FERMENTAÇÃO LÁTICA



A média de açúcares redutores, no período de 20 horas de fermentação foi maior em Fuji que Gala, 11,88 g/100mL e 10,73 g/100mL respectivamente, o que justifica a diferença estatística entre os sucos varietais. Houve também diferença entre o consumo de açúcares por *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* em suco de maçã Gala fermentado no pH original. Jorge, Treptow e Antunes (1996) também observaram esta maior quantidade de açúcares solúveis na maçã Fuji, quando a compararam com a variedade Granny Smith, em seus experimentos.

Em todos os tratamentos não houve consumo de glucose, sua concentração permaneceu constante durante as 20 horas de fermentação, sugerindo que houve o metabolismo da frutose, sacarose e ácido málico. No experimento de Mozzi et al. (2001), com objetivo de investigar a produção de exopolissacarídeos, em dois meios com diferentes fontes de carbono, galactose e glucose, foi observada a redução constante do pH até 3,75 no meio com galactose e até 3,25 para o meio com glucose.

Ao serem comparadas as curvas de consumo de açúcares com as de produção de ácido e as de crescimento celular observa-se que, quanto mais intensa a evolução da curva característica de fermentação malolática, maior o crescimento celular, com consumo constante de açúcar, comportamento evidenciado nos tratamentos com *Lactobacillus casei*. A fermentação com *Lactobacillus acidophilus* apresentou a evolução da curva característica de fermentação malolática menos intensa que a proporcionada pelo *Lactobacillus casei*, consumo constante de açúcares nos tratamentos com o suco de maçã Fuji, resultando no menor crescimento celular e, no suco da variedade Gala houve consumo intenso dos açúcares, promovendo maior crescimento microbiano.

Ao avaliar o ponto máximo de crescimento de um microrganismo para determinar o tempo ideal de fermentação do produto final, é necessário levar em consideração qual é o objetivo do estudo. Neste trabalho objetivou-se o desenvolvimento de um fermentado probiótico de suco de maçã. Para um produto ser considerado probiótico, ele deve conter elevado número de células do microrganismo probiótico, no mínimo 10^6 UFC/mL da bactéria em questão (ROBINSON¹⁵ apud SHAH, 2000) ou uma ingestão diária entre 10^8 e 10^{11} UFC/dia, para que ocorra o efeito benéfico desejado (VINDEROLA e REINHEIMER¹⁶ apud OLIVEIRA e DAMIN, 2003; DINAKAR e MISTRY¹⁷ apud VINDEROLA et al, 2000).

Foi determinado que o tempo ideal de fermentação encontra-se na fase logarítmica, ou seja, durante o crescimento e antes de chegar na fase estacionária, pois, se a fermentação for cessada neste momento, os microrganismos ainda possuem nutrientes suficientes para sua manutenção pelo prazo mínimo de 28 dias.

A tendência do crescimento de *Lactobacillus casei* em suco de maçã Gala e Fuji pode ser observada nas figuras 15 e 16, o delineamento experimental utilizado encontra-se nas tabelas 19 e 20.

X	Y
-1 = 0	-1 = 3,89
1 = 20	1 = 4,89

TABELA 19 – DELINEAMENTO ESTATÍSTICO DO pH E DO CRESCIMENTO DE *Lactobacillus casei* EM SUCO DE MAÇÃ GALA UTILIZADO NA FIGURA 15

x	Y	Z
20 (1)	4,89 (1)	8,2
20 (1)	3,89 (-1)	8,3
0 (-1)	4,89 (1)	7,8
0 (-1)	3,89 (-1)	7,73

x = tempo; y = pH; z = Log de UFC/mL

TABELA 20 – DELINEAMENTO ESTATÍSTICO DO pH E DO CRESCIMENTO DE *Lactobacillus casei* EM SUCO DE MAÇÃ FUJI UTILIZADO NA FIGURA 16

x	y	z
20 (1)	4,89 (1)	8,3
20 (1)	3,89 (-1)	8,2
0 (-1)	4,89 (1)	8,0
0 (-1)	3,89 (-1)	7,7

x = tempo; y = pH; z = Log de UFC/mL

FIGURA 15 – EFEITO DO pH NO CRESCIMENTO DE *Lactobacillus casei* EM SUCO DE MAÇÃ GALA EM 20 HORAS DE INCUBAÇÃO

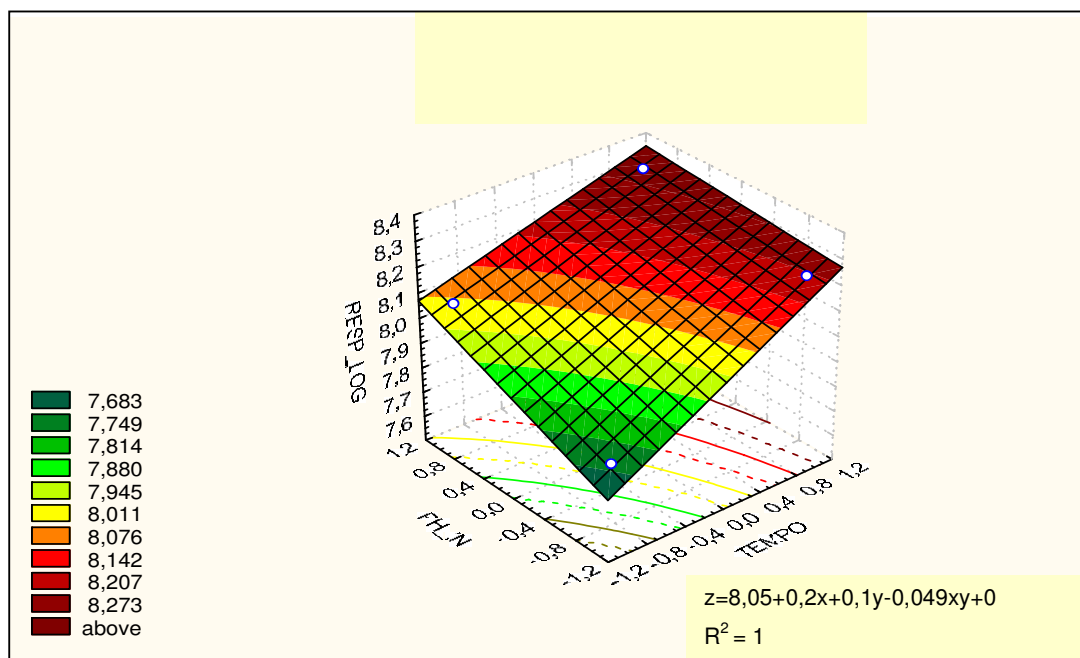
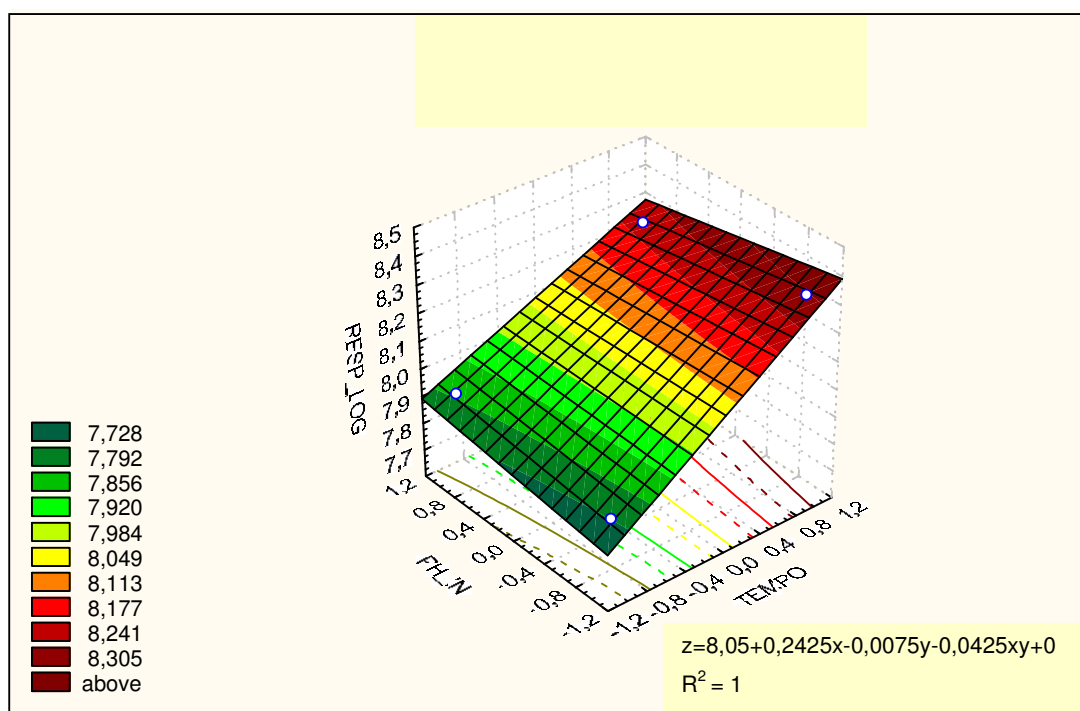


FIGURA 16 – EFEITO DO pH NO CRESCIMENTO DE *Lactobacillus casei* EM SUCO DE MAÇÃ FUJI EM 20 HORAS DE INCUBAÇÃO



As figuras 15 e 16 apresentam a tendência do crescimento para a obtenção da maior concentração de células e as condições ideais do binômio tempo-pH do meio. As análises de superfície de resposta dos tratamentos que apresentaram maior crescimento celular (tratamentos com *Lactobacillus casei* em maçã Fuji e Gala) indicam que em torno de 10 horas, independente do pH inicial no suco da variedade Fuji ocorre o crescimento exponencial das células de *Lactobacillus casei* e, sendo que na variedade Gala, o mesmo ocorre quando o pH inicial 4,0.

5.3 VIABILIDADE CELULAR DE *Lactobacillus casei* EM SUCO DE MAÇÃ FERMENTADO

Os dados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos coletados no tratamento com suco de maçã Gala fermentado com *Lactobacillus casei*, ao longo de 28 dias, são apresentados na figura 17 e tabela 21.

FIGURA 17 – MONITORAMENTO DA EVOLUÇÃO DO pH E DA ACIDEZ TITULÁVEL EM SUCO DE MAÇÃ GALA, FERMENTADO COM *Lactobacillus casei* SOB ARMAZENAMENTO REFRIGERADO POR 28 DIAS

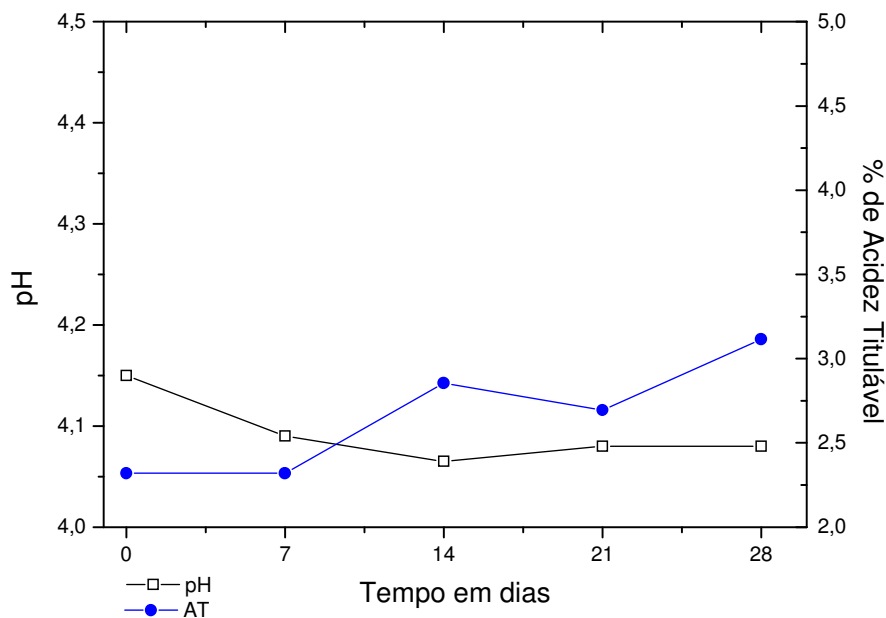


TABELA 21 – CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE *Lactobacillus casei* EM SUCO DE MAÇÃ GALA POR 28 DIAS À 8°C

Tempo (dias)	Log – UFC/mL				
	0	7	14	21	28
	8,4	8,5	8,1	8,5	8,5

No início da produção, o leite acidófilo (leite fermentado com *Lactobacillus acidophilus*) era considerado um veículo em potencial para consumidores receberem números adequados de microrganismo probiótico, porém, só era possível manter esse número de células viáveis por aproximadamente uma semana sob refrigeração (KOSIKOWSKI⁴⁸ *apud* NIGHSWONGER, BRASHEARS e GILLILAND, 1996). Kulp⁴⁹, citado por Nighswonger, Brashears e Gilliland (1996) descobriu que se durante a elaboração do produto fossem feitas algumas alterações no processamento desse leite acidófilo, como a adição de uma cultura suporte, seria possível manter a estabilidade do microrganismo probiótico por mais de uma semana. No caso do suco de maçã fermentado com *Lactobacillus casei* não foi preciso proceder modificações no processamento, como alteração de pH, adição de cultura suporte ou outros ingredientes e substratos que permitissem a manutenção dos microrganismos vivos, a simples adição do inóculo em LDR 10% e as condições de fermentação e armazenamento utilizadas foram suficientes para esta viabilidade.

O processamento do fermentado probiótico sem necessidade de alterações no produto final é interessante no ponto de vista econômico e de segurança do produto, pois isto não aumentará o custo nem os pontos de controle de contaminação, sendo que se trata de um produto probiótico.

Foram verificadas variações numéricas dos microrganismos durante o período de armazenamento, 28 dias, provavelmente, devido ao rompimento e reagrupamento de cadeias de bactérias, aumentando e diminuindo o número de células (SAXELIN et al. 1999).

Gardiner et al (1999) monitoraram o microrganismo probiótico *Enterococcus faecium*, por 21 dias em iogurte à 4°C, obtiveram uma queda de 0,2 Log de UFC/mL

⁴⁸ KOSIKOWSKI, F. V. **Cheese and Fermented Milk Products**. 2 ed. Ann Arbor: Edwards Brothers, 1977.

⁴⁹ KULP, W. L. Studies on the viability of *Lactobacillus acidophilus* in acidophilus milk. **American journal of Public Health**, v. 21, p. 873, 1931.

no número de células vivas, o que não ocorreu com o *Lactobacillus casei* em suco de maçã Gala, o qual foi possível manter a estabilidade celular.

Gilliland e Rich (1990) observaram a estabilidade do *Lactobacillus acidophilus* durante o congelamento e subsequente armazenamento refrigerado à 5°C, em diferentes valores de pH, de 5,0 à 7,0, com variação de 0,5. Estes pesquisadores constataram que o *Lactobacillus acidophilus* fermentado com pH inicial 5,0 obteve maior estabilidade e número de células em 21 dias, sem morte celular, confirmando os resultados de que é possível a estabilidade microbiológica de *Lactobacillus* spp, sob refrigeração em baixo pH. Já com pH inicial de fermentação 5,5 e 6,0, a morte celular foi maior que 1 ciclo logarítmico em 21 dias e ainda, Gilliland e Rich (1990) comentam que não somente as células serão mais estáveis sob estoque refrigerado, mas também, o crescimento a baixo pH poderá ajudar no controle de crescimento de organismos indesejados durante a fermentação.

É comum a suplementação do substrato de crescimento, ajuste do pH e o emprego de embalagens assépticas, durante a produção de alimentos funcionais contendo microrganismos viáveis. O congelamento ou a refrigeração são aplicados para estocagem e distribuição do produto, pois a temperatura de refrigeração é importante para controlar o crescimento destes microrganismos (KNORR, 1998).

Nighswonger, Brashears e Gilliland (1996) no estudo da viabilidade de cinco cepas de *Lactobacillus acidophilus* e de uma cepa de *Lactobacillus casei* em iogurte e leite fermentado, armazenados por 28 dias sob refrigeração, observaram a queda de 1 ciclo log dos *Lactobacillus acidophilus* e a estabilidade do *Lactobacillus casei* tanto no iogurte como no leite.

Houve estabilidade dos parâmetros físico-químicos do suco de maçã Gala fermentado e armazenado sob refrigeração por 28 dias (FIGURA 17). O monitoramento das células de *Lactobacillus casei* (TABELA 21) e a ausência de variação significativa ($p > 0,05$) em relação às análises de UFC/mL, pH e acidez titulável, indica a manutenção da viabilidade das células no suco de maçã fermentado.

5.4 ESTUDOS COMPLEMENTARES DO CRESCIMENTO DE *Lactobacillus casei*

5.4.1 Crescimento de *Lactobacillus casei* em Suco de Maçã, Variedade Sansa

As informações sobre o crescimento e evolução de acidez e pH do *Lactobacillus casei* em suco de maçã Sansa são apresentadas nas figuras 18, 19 e 20.

FIGURA 18 – EVOLUÇÃO DO LOG DE UFC/ML DE *Lactobacillus casei* EM SUCO DE MAÇÃ SANSA, DURANTE A FERMENTAÇÃO LÁTICA

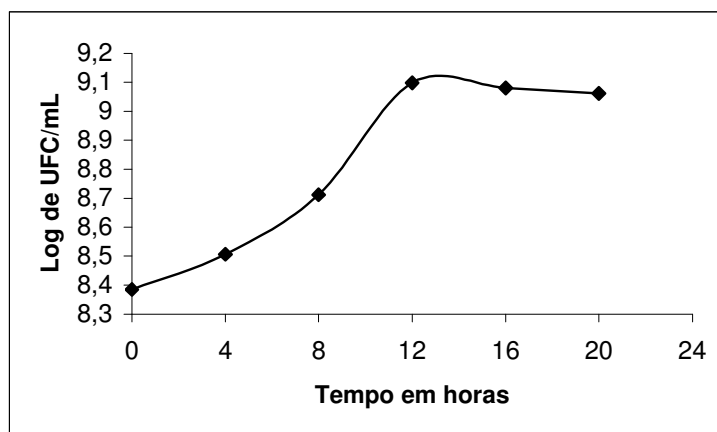


FIGURA 19 – EVOLUÇÃO DA ACIDEZ TITULÁVEL EM SUCO DE MAÇÃ DA VARIEDADE SANSO, DURANTE A FERMENTAÇÃO LÁTICA

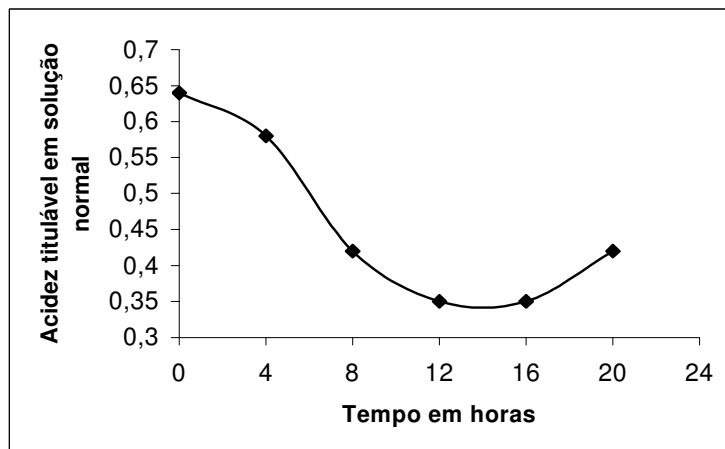
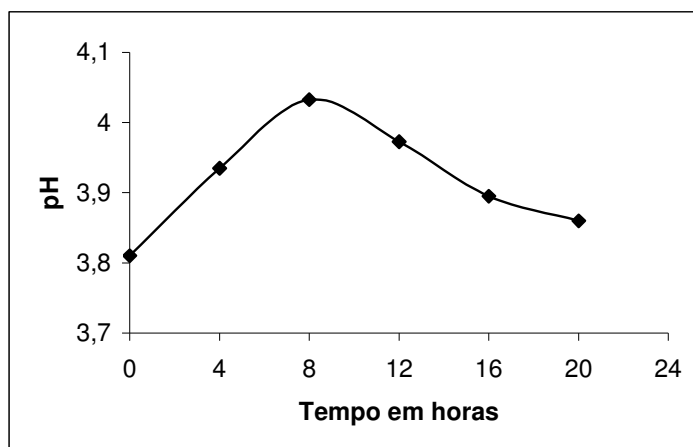


FIGURA 20 – EVOLUÇÃO DO pH EM SUCO DE MAÇÃ DA VARIEDADE SANSA, DURANTE A FERMENTAÇÃO LÁTICA



As maçãs contêm compostos bioativos como a pectina e o ácido málico. A variedade Sansa, em especial, é constituída por elevado teor de frutose, 9,32 g/100 mL proporcionando intenso sabor adocicado. Além disso, a frutose tem reduzido valor calórico (KOLETZKO et al., 1998). Após a definição das condições ideais de crescimento dos microrganismos probióticos, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*, optou-se por verificar a viabilidade de *Lactobacillus casei* nas condições já definidas como ótimas, em suco clarificado de maçã Sansa, possibilitando iniciar o desenvolvimento de mais uma opção de fermentado probiótico de suco de maçã.

Para tanto, o pico de desenvolvimento de *Lactobacillus casei* foi de 0,71 ciclo log de UFC/mL, em 12 horas (FIGURA 18), proporcionando o número adequado de microrganismos para um produto probiótico e as características do suco fermentado.

Foi observado também, que a tendência das curvas de pH e acidez titulável do *Lactobacillus casei* em suco de maçã Sansa (FIGURAS 19 e 20), são semelhantes as dos sucos de maçã Gala e Fuji.

5.4.2 Acompanhamento do Crescimento de *Lactobacillus casei* em Banho Termostatizado sob Agitação

Três tratamentos tiveram acompanhamento do pH, em banho termostatizado sob agitação acoplado em potenciômetro a 37°C, de hora em hora até totalizar 20 horas. Foram também analisados o número de células de *Lactobacillus casei* inicial e final, a determinação da concentração inicial e final de ácido málico e lático e ainda as concentrações inicial e final de açúcares redutores. Os tratamentos são 1 – Inóculo com LDR 10% + Suco gala; 2 - Inóculo com caldo MRS + Suco gala; 3 – Inóculo com suco Gala + Suco gala (FIGURA 21 e TABELA 22).

FIGURA 21 – EVOLUÇÃO DO pH EM SUCO DE MAÇÃ GALA COM DIFERENTES INÓCULOS, DURANTE A FERMENTAÇÃO LÁTICA

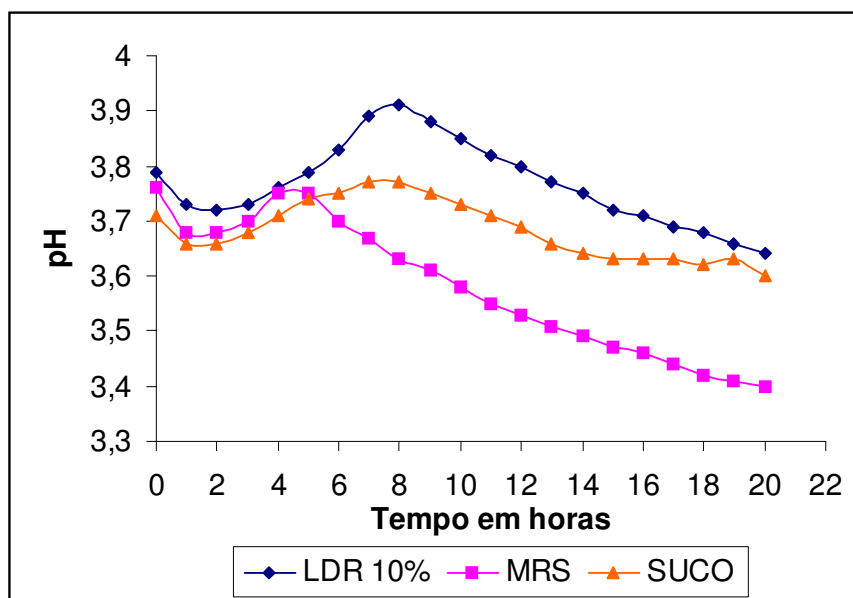


TABELA 22 – PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS E FÍSICO-QUÍMICOS EM SUCO DE MAÇÃ GALA COM DIFERENTES INÓCULOS, DURANTE A FERMENTAÇÃO LÁTICA

Tratamento	Log de UFC/mL		ARS g/100mL		Ácido málico g/100mL		Ácido lático g/100mL	
	0h	20h	0h	20h	0h	20h	0h	20h
LDR	7,7	8,3	9,94	8,48	0,3116	0,0393	0,2977	0,4335
MRS	8,4	8,5	9,54	8,12	0,157	0,141	0,2312	0,9829
SUCO	7,72	7,91	9,42	9,38	0,113	0,1214	0,4731	0,6879

A evolução da curva de pH, da fermentação de 20 horas com diferentes inóculos de *Lactobacillus casei*, apresenta as curvas com os inóculos de LDR e suco semelhantes e características da fermentação malolática, porém o aumento do pH foi mais intenso no meio com inóculo de LDR. Verificando as concentrações iniciais e finais de ácido málico e láctico, nestes tratamentos, ocorreu uma produção igual de ácido láctico, 31%, porém, o consumo de ácido málico diferente, 87 e 6,9% respectivamente. Esta diferença, possivelmente, deu-se em razão da variação do crescimento celular, ou seja, enquanto que a diferença do número de células, inicial e final, no tratamento 1 foi de 0,6 ciclos log, no tratamento 3 foi de 0,2 ciclos log, interferindo na quantidade de ácido e açúcares consumidos. Este número reduzido de microrganismos torna a fermentação lenta e, se comparado ao tratamento 1, obteve reduzido consumo de açúcares redutores (JOHANNINGSMEIER, FLEMING e BREIDT, 2004).

A curva do fermentado com inóculo de caldo MRS apresenta um aumento do pH em 4 e 5 horas e posteriormente uma redução constante do parâmetro. O consumo de ácido málico, deste tratamento, foi de 10% e a produção de ácido láctico de 76%, porém o consumo de açúcares foi comparável ao do suco fermentado com inóculo de LDR 10%. Em relação ao número de células, o suco inoculado com caldo MRS obteve 0,1 ciclos log a mais que inicialmente.

Nos experimentos de Garcerá et al. (1992), onde avaliaram o crescimento e o metabolismo do L-ácido málico por *Lactobacillus plantarum*, em meio suplementado somente com glucose, houve um crescimento exponencial do microrganismo (0,1 ciclos log) e a diminuição do pH do meio (de 5,5 para 3,5) em 20 horas. Este resultado foi semelhante à evolução do pH do *Lactobacillus casei* em suco de maçã com inóculo de caldo MRS e com o mesmo crescimento no mesmo tempo. Estes mesmos pesquisadores observaram que o maior crescimento do *L. plantarum*, 0,15 ciclos log em 20 horas, ocorreu no meio com presença de glucose e alta concentração de L-ácido málico (5 g/L), na curva de crescimento, as células entraram em fase estacionária quando o ácido estava quase completamente degradado, enquanto existia a presença de quantidade considerável de glucose.

Garcerá et al. (1992) também observaram que a degradação do ácido málico teve maior influência no crescimento dos microrganismos. Da mesma forma, o *Lactobacillus casei*, quando apresentou uma maior tendência de fermentação

malolática no crescimento em suco de maçã com inóculo de LDR 10%, obteve maior crescimento celular.

O aumento do pH é explicado pelo metabolismo do ácido málico que compensa a diminuição do pH do meio produzido pela fermentação de açúcares e a cultura láctica pode degradar mais açúcares na presença de L-ácido málico do que na sua ausência (VARNAM e SUTHERLAND, 1999; GARCERÁ et al., 1992). O L-malato pode agir como uma substância tamponante e produz o aumento da razão de crescimento celular quando comparado a outros compostos tamponantes (DAESCHEL⁵⁰ *apud* GARCERÁ et al., 1992).

Garcerá et al. (1992) também notaram que é possível o crescimento de *L. plantarum* em meio suplementado somente com L-ácido málico, porém, o crescimento é lento e pode chegar a 0,25 ciclos log em 120 horas. Em 20 horas obtiveram 0,04 ciclos log, enquanto que o *Lactobacillus casei* com inóculo em suco de maçã Gala teve crescimento de 0,2 ciclos log.

É sabido que somente as bactérias lácticas podem fazer a fermentação malolática quando há presença de glucose, caso contrário a única forma de transformar L-ácido málico em láctico é por meio da enzima málica (GARCERÁ et al., 1992).

García et al.⁵¹ citado por GARCERÁ et al. (1992), observaram a degradação do malato por células de *L. plantarum* não proliferantes em pH 3,0, quando o nível de ATP intracelular está muito baixo. Schütz e Radler³⁴ encontraram tanto a atividade malolática quanto a enzima málica em *Lactobacillus casei*, porém, a primeira depende da presença de glucose e a segunda é reprimida pela presença da glucose (GARCERÁ et al., 1992).

Göekmen, Acar e Taydas (2003) avaliaram a concentração inicial de D- e L-ácido láctico e de ácido málico em suco de maçã da variedade Golden Delicious, com inóculo direto de *Lactobacillus plantarum*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium expansum* e com um inóculos com a mistura de todos estes microrganismos, que são contaminantes naturais do suco de maçã, por 2, 3 e 4 dias em temperaturas de 35°C

⁵⁰ DAESCHEL, M. A. A pH control system based on malate decarboxylation for the cultivation of lactic acid bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1627, 1988.

⁵¹ GARCÍA, M. J. et al. Physiological role of malo-lactic fermentation. **FEMS Microbiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 2-77, 1990.

e 25°C, de acordo com a especificidade de cada microrganismo. Em seus experimentos, a maior produção de ácido láctico foi do *L. plantarum* em 20% e o maior consumo de ácido málico ocorreu com o tratamento onde todos os microrganismos participaram da fermentação, com 15%. Confrontando estes dados aos resultados com inóculo de *Lactobacillus casei* em suco de maçã Gala, este microrganismo apresentou melhor rendimento de ácido láctico e maior consumo de ácido málico.

Os números de células iniciais e finais não são indicadores confiáveis de crescimento, pois a evolução da curva de multiplicação dos microrganismos engloba 4 fases: a fase lag, onde parece não haver aumento no número de microrganismos, a fase log ou de crescimento propriamente dito, a fase estacionária, onde as células não se multiplicam, mas podem consumir substratos do meio para sua manutenção e a fase de morte celular, onde o número de microrganismos decresce exponencialmente (PELCZAR, CHAN e KRIEG, 1996). Então, a tomada de amostras para contagem de células no início da fermentação e no fim tem a função de constatar a variação do crescimento celular e com o acompanhamento de alguns parâmetros físico-químicos, como pH, acidez, quantificação de açúcares, é possível avaliar globalmente esta multiplicação microbiana. Comparando os resultados da tabela 22, observou-se que o tratamento com LDR 10% obteve maior crescimento celular. Caso os demais tratamentos, antes de 20 horas de fermentação, tenham tido um número de células por mL do meio maior que o indicado na tabela 22, ou este foi um pouco acima do apresentado, ou a fase de morte celular foi intensa demonstrando instabilidade celular, fatos negativos que contribuem para a não continuidade do trabalho para a análise da viabilidade do produto com o caldo MRS e com o suco de maçã como inóculo.

Um quarto experimento foi realizado com inóculo de LDR 10% + Suco gala, porém, o pH do meio de crescimento foi mantido constante em 4,0. Deste tratamento foram coletados os dados de número de microrganismos e concentração de açúcares total, solúvel, glucose, frutose, sacarose, graus Brix, acidez titulável, no tempo 0 e em 20 horas (TABELA 23).

TABELA 23 – PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS E FÍSICO-QUÍMICOS DO SUCO DE MAÇÃ GALA FERMENTADO COM INÓCULO DE LDR 10% E pH 4,0 CONSTANTE

Variáveis	TEMPO EM HORAS	
	0	20
° Brix	12,25	11,00
ART g/100mL	10,26	9,26
ARS g/100mL	8,58	6,85
Glucose g/100mL	2,10	1,59
Frutose g/100mL	6,48	5,26
Sacarose g/100mL	1,68	2,41
Log de UFC/mL	8,7	9,0

O *Lactobacillus casei* nessas condições de crescimento, apresentou consumo de açúcares redutores de 20,16%, aproximou-se muito dos resultados apresentados por T2 e T3, La-5 em maçã Gala e Lcc em maçã Fuji, respectivamente, sendo os três tratamentos com maior consumo de açúcares.

Como já discutido, o número de células final não representa o ponto máximo da fase log da curva de crescimento, mas é indicativo do crescimento celular. A diferença do número inicial e final de células foi de 0,3 ciclos log, por mais que tenha tido um pequeno aumento, se comparado ao tratamento 1, mostrou-se mais eficiente que o 2 e o 3, desta seção.

5.5 ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA

As etapas da análise descritiva quantitativa encontram-se na seqüência da pré-seleção de provadores, levantamento de terminologia descritiva, treinamento, seleção final e avaliação final das amostras.

Para a seleção dos provadores foram aplicados os testes de reconhecimento de odores e de gostos básicos, apenas 12 dos 30 provadores conseguiram o percentual mínimo considerado de 70% e 100% nos respectivos testes.

Os provadores selecionados seguiram para a etapa de levantamento da terminologia comparando duas amostras e descrevendo suas diferenças. Os termos descritivos levantados pelos provadores encontram-se no quadro 1. Em seguida, foram definidos em discussão com o grupo, os termos das características representativas das amostras como para aparência: cor caramelo; para aroma:

maçã; para sabor: ácido, maçã e doce; e para textura: encorpada e, suas definições (QUADRO 2).

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS ATRIBUTOS SENSORIAIS OBTIDOS DAS FICHAS DE TODOS OS PROVADORES, COM A INDICAÇÃO DO NÚMERO DE VEZES (N) EM QUE CADA ATRIBUTO FOI CITADO.

APARÊNCIA Atributo	N	AROMA Atributo	N	GOSTO Atributo	N	TEXTURA Atributo	N
Amarela	5	Fermentado	2	Amargo	2	Aguada	8
Castanha	6	Característico	1	Azedo	1	Encorpada	3
Turva	1	Maçã	9	Ácido	4	Amarga	1
		Canela	1	Adstringente	1	Água	2
		Frutal	1	Doce	3	Viscoso	1
		Açúcar	1	Maçã	5		
		Baunilha	1	Canela	1		
		Mel	1	Limão	1		

QUADRO 2 – DEFINIÇÕES E REFERÊNCIAS PARA OS ATRIBUTOS DA ADQ.

ATRIBUTO	DEFINIÇÃO E REFERÊNCIA
Cor caramelo (aparência)	Cor amarela escura, semelhante à açúcar queimado. - Fraco: 70% suco de maçã Fuji + 30% de LDR. - Intenso: 90% suco de maçã Fuji + 10% de LDR.
Aroma de maçã	Aroma característico da fruta maçã madura. - Ausente: água. - Forte: 100% suco de maçã Fuji.
Gosto ácido	Que dá sensação de picante ao paladar, azedo. - Ausente: água. - Muito: água com ácido málico até pH 3,0.
Gosto de maçã	Sabor característico da fruta maçã. - Ausente: água. - Muito: 100% suco de maçã Fuji.
Gosto doce	Relacionado ao açúcar, adocicado. - Ausente: água. - Muito: 250mL de água + 65 g de sacarose.
Textura encorpada	Sensação de preenchimento (recobrimento) da boca. - Ausente: água. - Muito: 90% de suco de maçã Fuji e 10 % de LDR.

Após 10 sessões de treinamento com os padrões definidos, foram realizadas 3 sessões para a avaliação do treinamento e seleção final dos provadores. Os resultados foram tratados com análise de variância para cada provador por atributo, considerando as fontes de variação amostra e repetição, e níveis de significância, $p > 0,50$ para amostra e $p \leq 0,05$ para repetição e as médias das intensidades dos

provadores por atributo, por amostra e da equipe (construídas para avaliar a concordância da equipe), mostraram que poucos provadores não conseguiram discriminar as amostras em algumas características (QUADRO 3), mas todos obtiveram bons resultados sobre a repetição (QUADRO 4). Alguns provadores apresentaram médias significativamente diferentes, ou por falta de treinamento ou por utilizar uma porção diferente da escala.

QUADRO 3 – NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA PARA PROVADORES EM FUNÇÃO DE DISCRIMINAÇÃO DAS AMOSTRAS ($F_{amostra}$)

	Aparência	Aroma	Gosto			Textura
Provador	Cor caramelo	Maçã	Doce	Ácido	Maçã	Encorpado
1	0.1124	0.1625	0.2333	0.4374	0.3915	0.8641
2	0.1666	0.0083	0.1083	0.0248	0.1221	0.5112
3	0.0455	0.5205	0.2282	0.3069	0.3036	0.1523
4	0.3529	0.1152	0.0006	0.0474	0.0927	0.0818
5	0.0809	0.0006	0.6326	0.0805	0.5034	0.5288
6	0.3782	0.7279	0.0213	0.0021	0.1188	0.0710
7	0.4226	0.2086	0.6803	0.1634	0.4226	0.1535
8	0.7285	0.2575	0.0966	0.4226	0.0509	0.2860
9	0.7007	0.6827	0.1471	0.7618	0.1600	0.5739
10	0.6434	0.0586	0.6332	0.3524	0.2274	0.3316
11	0.9049	0.2664	0.8266	0.0233	0.0227	0.0809
12	0.0094	0.0477	0.0034	0.0024	0.0070	0.5791

Valores assinalados em vermelho referem-se àquelas para $p_{Famostra} > 0,50$.

QUADRO 4 – NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA PARA PROVADORES EM FUNÇÃO DE DISCRIMINAÇÃO DAS REPETIÇÕES ($F_{repetição}$)

	Aparência	Aroma	Gosto			Textura
Provador	Cor caramelo	Maçã	Doce	Ácido	Maçã	Encorpado
1	0.5132	0.7112	0.8131	0.5253	0.5086	0.0550
2	0.4590	0.5132	0.6820	0.3245	0.5700	0.5566
3	0.5695	0.9719	0.5131	0.4921	0.6189	0.4540
4	0.6719	0.6909	0.2078	0.5448	0.4799	0.3517
5	0.3105	0.2769	0.6181	0.8057	0.4622	0.6075
6	0.3910	0.6536	0.2024	0.0538	0.3727	0.1661
7	0.5000	0.5000	0.8046	0.4334	0.5000	0.3766
8	0.6630	0.7812	0.1737	0.5000	0.3700	0.2126
9	0.8203	0.5359	0.4349	0.3899	0.3006	0.4669
10	0.7947	0.4717	0.9149	0.4871	0.4735	0.3552
11	0.7752	0.5304	0.1469	0.5000	0.3740	0.5532
12	0.7756	0.4891	0.2039	0.4719	0.4528	0.6049

Valores assinalados em vermelho referem-se àquelas para $p_{Frepetição} < 0,050$

A análise final das amostras, suco puro de maçã Gala, fermentado no tempo zero e fermentado e armazenado por 30 dias, contou com 12 provadores selecionados e treinados. As amostras foram avaliadas individualmente, com três repetições.

A interação amostra x provador foi significativa ($p > 0,05$) (TABELAS de 24 a 29), indicando que pelo menos um provador avaliou as amostras de forma não consensual com a equipe. Em decorrência disto, foram construídos gráficos de tendência, para cada atributo (APÊNDICES de 1 a 6), para que pudessem ser subtraídos os dados dos provadores em desacordo com a média da equipe. A diferença significativa entre os provadores indica a utilização de diferentes porções na escala não estruturada da avaliação e, a diferença significativa entre as amostras indica que pelo menos uma amostra é diferente naquele atributo.

TABELA 24 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O ATRIBUTO DA APARÊNCIA, COR CARAMELO, DE AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ FERMENTADO COM *Lactobacillus casei*

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Valor de F	p
Amostra	2	363,38	181,69	76,24	0,0001*
Provador	10	61,78	6,17	2,59	0,0103*
Interação	20	118,11	5,90	2,48	0,0031*
Resíduo	66	157,28	2,38		
Total	98	700,56			

TABELA 25 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O ATRIBUTO AROMA MAÇÃ DE AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ FERMENTADO COM *Lactobacillus casei*

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Valor de F	p
Amostra	2	276,53	138,26	97,12	0,0001*
Provador	11	188,25	17,11	12,02	0,0001*
Interação	22	91,43	4,15	2,92	0,0003*
Resíduo	72	102,50	1,42		
Total	107	658,73			

TABELA 26 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O SABOR ÁCIDO DE AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ FERMENTADO COM *Lactobacillus casei*

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Valor de F	p
Amostra	2	107,81	53,90	15,32	0,0001*
Provador	10	188,50	18,85	5,36	0,0001*
Interação	20	218,53	10,92	3,11	0,0003*
Resíduo	66	232,20	3,51		
Total	98	747,05			

TABELA 27 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O SABOR MAÇÃ DE AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ FERMENTADO COM *Lactobacillus casei*

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Valor de F	p
Amostra	2	175,99	87,99	82,37	0,0001*
Provador	11	260,24	23,65	22,14	0,0001*
Interação	22	96,82	4,40	4,12	0,0001*
Resíduo	72	76,92	1,06		
Total	107	609,98			

TABELA 28 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O ATRIBUTO GOSTO DOCE DE AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ FERMENTADO COM *Lactobacillus casei*

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	p
Amostra	2	42,17	21,08	16,03	0,0001*
Provador	11	349,82	31,80	24,18	0,0001*
Interação	22	58,50	2,65	2,02	0,0136*
Resíduo	72	94,71	1,31		
Total	107	545,22			

TABELA 29 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O ATRIBUTO TEXTURA ENCORPADA DE AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ FERMENTADO COM *Lactobacillus casei*

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Valor de F	p
Amostra	2	286,41	143,20	71,46	0,0001*
Provador	8	152,09	19,01	9,49	0,0001*
Interação	16	114,69	7,16	3,58	0,0002*
Resíduo	54	108,22	2,00		
Total	80	661,42			

Para o atributo cor caramelo, foram consideradas as avaliações de 9 provadores e a ANOVA refeita (TABELA 30), resultando em uma interação amostra*provador não significativa. Sendo assim, o suco de maçã puro apresentou a cor caramelo mais intensa e não houve diferença significativa entre os sucos fermentados, isto é, devido à adição do inóculo com *Lactobacillus casei* ocorreu a diminuição da característica de cor caramelo do suco puro.

TABELA 30 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O ATRIBUTO DA APARÊNCIA, COR CARAMELO, DE AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ FERMENTADO COM *Lactobacillus casei*

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Valor de F	p
Amostra	2	248,75	124,37	43,00	0,0001*
Provador	8	54,95	6,87	2,38	0,0286*
Interação	16	57,32	3,58	1,24	0,27
Resíduo	54	156,18	2,89		
Total	80	517,21			

Para o atributo aroma de maçã foram considerados os resultados de 9 provadores (TABELA 31) e houve diferença significativa entre as amostras. O suco puro foi identificado como a amostra com maior intensidade deste aroma, sendo que o crescimento das bactérias consumiu e produziu compostos que alteraram seu aroma e sabor. Esta mesma observação ocorre com o atributo gosto de maçã (TABELA 32), onde foram eliminados 3 provadores.

TABELA 31 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O ATRIBUTO AROMA MAÇÃ DE AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ FERMENTADO COM *Lactobacillus casei*

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	p
Amostra	2	286,19	143,10	80,80	0,0001*
Provador	8	87,87	10,98	6,20	0,0001*
Interação	16	48,22	3,01	1,70	0,0746
Resíduo	54	95,64	1,77		
Total	80	517,92			

TABELA 32 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O GOSTO DE MAÇÃ DE AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ FERMENTADO COM *Lactobacillus casei*

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	Valor de F	p
Amostra	2	131,11	65,56	49,93	0,0001*
Provador	8	115,33	14,42	10,98	0,0001*
Interação	16	37,69	2,36	1,79	0,0566
Resíduo	54	70,90	1,31		
Total	80	355,03			

O resultado de 7 provadores foi utilizado para a avaliação sensorial do atributo sabor ácido (TABELA 33). O suco fermentado com 30 dias apresenta sabor ácido foi mais pronunciado, o que também pôde ser observado através das análises físico-químicas do suco (FIGURA 17). Esse aumento da acidez é procedente do

metabolismo das bactérias para a manutenção de sua atividade durante o período de armazenamento.

TABELA 33 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O GOSTO ÁCIDO DE AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ FERMENTADO COM *Lactobacillus casei*

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Valor de F	p
Amostra	2	85,42	42,71	13,41	0,0001*
Provador	6	151,59	25,27	7,93	0,0001*
Interação	12	35,14	2,93	0,92	0,5367
Resíduo	42	133,79	3,19		
Total	62	405,94			

Para a tabulação do atributo gosto doce, foram utilizados os resultados de 10 provadores (TABELA 34). Sensorialmente não houve diferença na doçura entre o suco puro e o fermentado com 0 dias, fisicoquimicamente, a diminuição de açúcares redutores foi de 14,5%, considerando 100% no suco puro, porém, os provadores caracterizaram o suco fermentado com 30 dias como menos doce, provavelmente devido ao consumo do açúcar para a manutenção das células pelo período de armazenamento.

TABELA 34 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O ATRIBUTO GOSTO DOCE DE AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ FERMENTADO COM *Lactobacillus casei*

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	p
Amostra	2	62,40	31,20	25,65	0,0001*
Provador	9	242,43	26,94	22,14	0,0001*
Interação	18	30,69	1,71	1,40	0,1644
Resíduo	60	72,99	1,22		
Total	89	408,51			

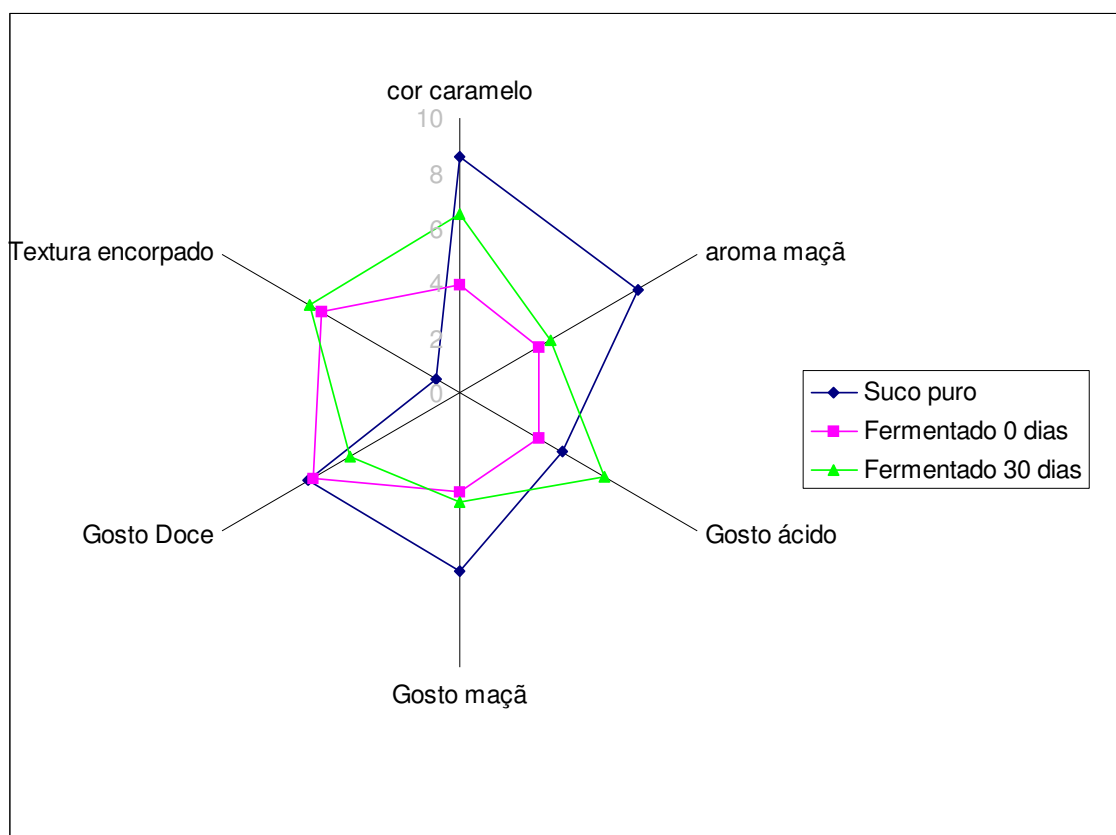
A textura encorpada com médias maiores nos sucos fermentados e diferentes significativamente do suco puro, explica-se pela biomassa das bactérias adicionadas (TABELA 35).

TABELA 35 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O ATRIBUTO TEXTURA ENCORPADA DE AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ FERMENTADO COM *Lactobacillus casei*

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Valor de F	p
Amostra	2	361,97	180,99	92,60	0,0001*
Provador	6	70,19	11,70	5,99	0,0001*
Interação	12	26,03	2,17	1,11	0,3780
Resíduo	42	82,09	1,95		
Total	62	540,27			

A representação em diagrama no modelo de aranha (FIGURA 22) permite acompanhar a intensidade de cada atributo para cada tratamento da ADQ. O suco puro é caracterizado pela cor caramelo, aroma e gosto de maçã e gosto doce. O gosto ácido é um pouco menos acentuado que os primeiros citados e a textura encorpada não faz parte de sua caracterização.

FIGURA 22 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS RESULTADOS DE ADQ DA MÉDIA DOS ATRIBUTOS COR CARAMELO, AROMA MAÇÃ, GOSTO ÁCIDO, MAÇÃ E DOCE E TEXTURA ENCORPADA.

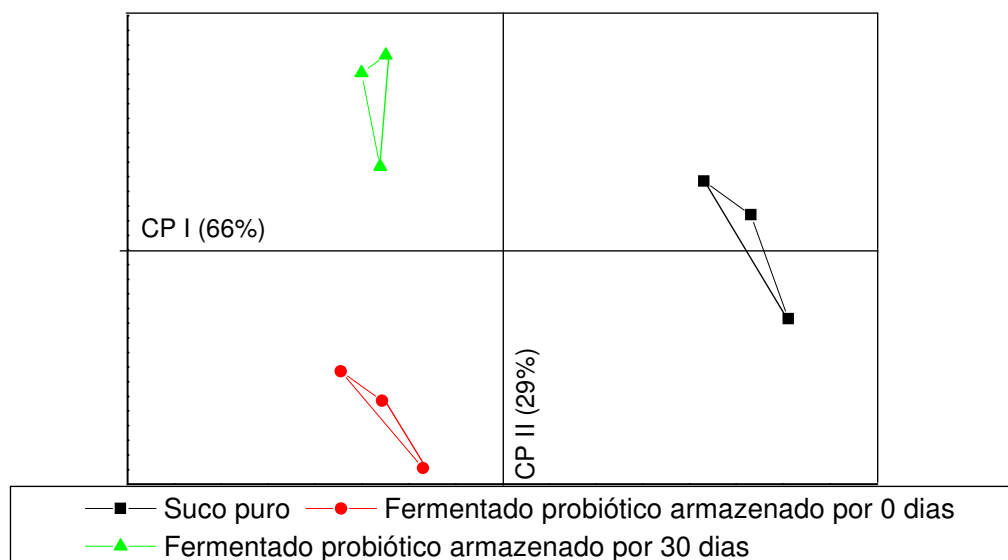


O fermentado probiótico com tempo de armazenamento de 0 dias difere do fermentado probiótico com tempo de armazenamento de 30 dias, no gosto doce mais acentuado e o gosto ácido e a cor caramelo menos intensos, sendo as demais características semelhantes.

Pela análise de componentes principais (ACP) (FIGURA 23), é possível perceber as relações existentes entre as amostras e a evidência de quais os atributos que mais as caracterizam (FIGURA 24) são apresentados por esta análise (LIMA et al., 1999).

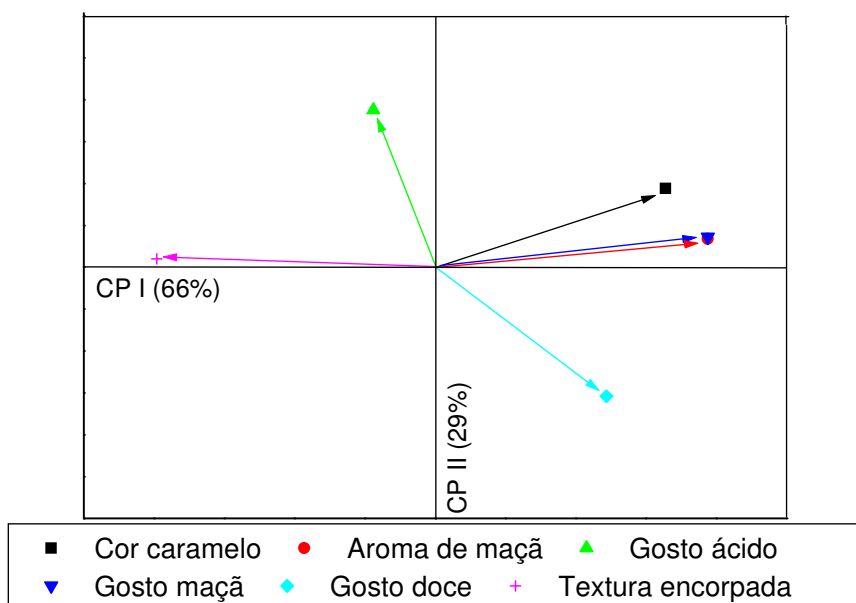
Tanto o suco puro quanto os fermentados probióticos possuem características próprias, por que, de acordo com Van Kranenburg et al.⁵² citado por Leroy e De Vuyst (2004), as bactérias lácticas contribuem no aroma e sabor dos produtos fermentados, acidificam o alimento e produzem compostos aromáticos pela conversão de aminoácidos.

FIGURA 23 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP) DE SUCO DE MAÇÃ PURO E PROBIÓTICO



⁵² VAN KRANENBURG, R. et al. Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome séquense análise. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 111-121, 2002.

FIGURA 24 –INTENSIDADE DOS ATRIBUTOS SENSORIAIS



As amostras são representadas por triângulos, cujos vértices indicam as médias de cada repetição realizada pela equipe sensorial, demonstrando que as amostras de suco fermentado obtiveram melhor repetibilidade que a amostra de suco puro, sendo que as três amostras foram distintamente discriminadas.

O primeiro componente principal (CP I) da análise do suco de maçã e dos fermentados probióticos nos tempos 0 e 30 dias de armazenamento, explicou 66% da variação total que existe entre as amostras e, os dois componentes principais (CP I e CP II), explicaram 95% da variabilidade entre as amostras.

Ainda é possível observar, que as amostras são caracterizadas por diferentes atributos, porém, de intensidades semelhantes.

Na análise de componente principal, as amostras da figura 23 estão localizadas na mesma região dos atributos da figura 24, que as caracterizam quando os espaços das amostras e dos atributos são sobrepostos. Apesar das amostras serem distintas, possuem características em comum, ou seja, não significa que se o vetor não estiver sobreposto à amostra, esta não apresenta a característica, mas sim em menor intensidade.

O suco puro de maçã Gala é definido pela cor caramelo, sabor e aroma de maçã e gosto doce. No fermentado probiótico antes do armazenado, os atributos

textura encorpada e gosto doce são mais intensos, e o fermentado probiótico armazenado por 30 dias, caracteriza-se pelo gosto ácido e textura encorpada (FIGURA 22 e TABELA 36).

O eixo de CP II é possível de ser explicado, somente pelo gosto ácido e pelo gosto doce.

Os vetores próximos indicam entre quais atributos existe correlação positiva, como os vetores dos atributos cor caramelo, sabor e aroma de maçã (SILVA et al, 1994).

O gosto doce apresenta uma correlação linear negativa com o gosto ácido e, a textura encorpada com o gosto e aroma de maçã. Isto significa que as amostras mais doces são menos ácidas e àquelas que possuem sabor e aroma acentuado de maçã, apresentam textura pouco encorpada e vice versa. Fisicoquimicamente não houve diferença significativa na acidez titulável em 30 dias, o que só foi percebido sensorialmente. A correlação negativa entre a acidez e a doçura ocorre devido a interação dos gostos básicos, que podem mascarar ou reforçar o outro (DUTCOSKY, 1996), mas isto não significa que houve consumo significativo dos açúcares.

TABELA 36 – MÉDIA DOS ATRIBUTOS SENSORIAIS DAS TRÊS AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ AVALIADAS, CONFORME DETERMINADO PELA EQUIPE SENSORIAL NO TESTE DE ADQ.

Atributos	Amostras		
	Suco de maçã Gala	Fermentado probiótico com 0 dias de armazenamento	Fermentado probiótico com 30 dias de armazenamento
Aparência			
Cor caramelo**	7,83 ^a	3,54 ^b	5,84 ^b
Aroma			
Maçã**	7,53 ^a	3,32 ^b	3,80 ^b
Gosto			
Ácido***	4,30 ^a	3,32 ^a	6,13 ^b
Maçã**	6,49 ^a	3,60 ^b	4,04 ^b
Doce*	6,43 ^a	6,21 ^a	4,56 ^b
Textura			
Encorpada***	0,99 ^a	5,81 ^b	6,31 ^b

* Médias de 10 provadores

** Médias de 9 provadores

*** Médias de 7 provadores

Médias com a mesma letra, na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.6 ANÁLISE SENSORIAL DE ACEITAÇÃO

Após o estabelecimento das condições ideais de fabrico de um produto, é necessário investigar sua aceitação sensorial pelo consumidor. Existem situações em que o resultado final do processo ainda não pode ser considerado como produto final, pois necessita de modificações físico-químicas que proporcionem mudanças sensoriais, com o objetivo de satisfazer o paladar do consumidor.

Por se tratar de uma análise a ser aplicada com consumidores em potencial, de diversas idades e de ambos os sexos, além do fermentado probiótico com *Lactobacillus casei*, neste foram acrescentados dois ingredientes com função interferente de sabor, a sacarose e o outro, interferente na textura, o amido modificado, o que garantiria a satisfação dos diferentes paladares.

A frequência da aceitação dos diferentes graus de apreciação encontram-se no quadro 5 e figura 25.

QUADRO 5 – FREQUÊNCIA E PROPORÇÕES DOS PROVADORES EM RELAÇÃO ÀS FORMULAÇÕES E GRAUS DE APRECIAÇÃO DO FERMENTADO DE SUCO DE MAÇÃ

Grau de Apreciação											
Formu- lação	Gostei muito		Gostei ligeiramente		Indiferente		Desgostei ligeiramente		Desgostei muito		Total ni.
	Fre- quência	Propor- ção	Fre- quência	Propor- ção	Fre- quência	Propor- ção	Fre- quência	Propor- ção	Fre- quência	Propor- ção	
Açúcar	n ₁₁ = 44	p ₁₁ = 0,721	n ₁₂ = 11	p ₁₂ = 0,180	n ₁₃ = 2	p ₁₃ = 0,0328	n ₁₄ = 1	p ₁₄ = 0,0164	n ₁₅ = 3	p ₁₅ = 0,049	n _{1.} = 61
Amido	n ₂₁ = 30	p ₂₁ = 0,526	n ₂₂ = 21	p ₂₂ = 0,368	n ₂₃ = 2	p ₂₃ = 0,035	n ₂₄ = 3	p ₂₄ = 0,052	n ₂₅ = 1	p ₂₅ = 0,0175	n _{2.} = 57
Puro	n ₃₁ = 40	p ₃₁ = 0,678	n ₃₂ = 17	p ₃₂ = 0,288	n ₃₃ = 1	p ₃₃ = 0,017	n ₃₄ = 1	p ₃₄ = 0,017	n ₃₅ = 0	p ₃₅ = 0	n _{3.} = 59
Total n_{.j}	n _{.1} = 114		n _{.2} = 49		n _{.3} = 5		n _{.4} = 5		n _{.5} = 4		n = 177

Onde:

n_{ij} = número de provadores que avaliaram o i sabor e expressaram o j grau de apreciação;

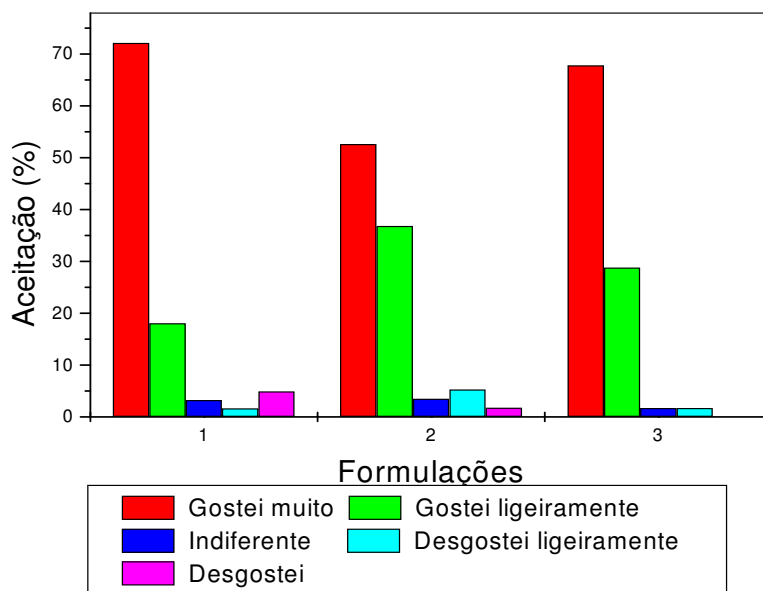
p_{ij} = $\frac{n_{ij}}{n_{j.}}$ = proporção de provadores que avaliaram o i sabor e expressaram o j grau de apreciação;

i = formulação;

j = graus de apreciação;

. = soma dos valores.

FIGURA 25 – PORCENTAGEM DE ACEITAÇÃO DAS FORMULAÇÕES F1, F2 E F3.



Formulações: 1 – Fermentado probiótico puro; 2 – Adição de 2% de sacarose; 3 – Adição de 1% de amido modificado.

É possível observar que as três formulações, fermentado probiótico com *Lactobacillus casei*, adicionado de sacarose e adicionado com amido modificado, obtiveram maior pontuação nos graus de apreciação “gostei muito” e “gostei ligeiramente”. Estes dois graus de apreciação obtiveram juntos, uma aceitação de 90%, 89% e 96% para as formulações com amido, sacarose e o fermentado puro respectivamente.

Para verificar se a aceitabilidade do produto foi influenciada pelas diferentes formulações, ao erro de 5%, foi aplicado o teste de Goodman (APÊNDICE 7), resultando em Y^2 menor que X^2 , ou seja, não há diferença na aceitação entre as formulações.

O presente trabalho resultou em um fermentado probiótico com *Lactobacillus casei* de suco de maçã Gala com pH 4,05, acidez titulável de 0,28 mL de solução normal por 100 mL de amostra, 8,2 Log de unidades formadoras de colônia por mL, 9,2g/100mL de açúcares redutores, com potencial de consumo enquanto probiótico, por 28 dias. Sensorialmente este suco é caracterizado pelos atributos textura

encorpada e gosto doce, quando armazenado por 30 dias pela textura encorpada e pelo gosto ácido e, obteve 96% de aceitação sensorial.

6 CONCLUSÕES

Em estudos de crescimento e viabilidade de duas espécies de *Lactobacillus* em suco de maçã clarificado das variedades Gala, Fuji e Sansa, assim como na caracterização e avaliação sensorial do produto final definido, foi possível concluir que:

- O *Lactobacillus casei* apresentou maior número de unidades formadoras de colônia no suco de maçã Gala que o *Lactobacillus acidophilus*.
- O número de células viáveis, no produto fermentado, é suficiente para indicar o suco fermentado como alimento probiótico.
- Não há necessidade de correção do pH original dos sucos para a produção do fermentado probiótico.
- O período de incubação de 10 horas, foi o melhor para *Lactobacillus casei* tanto em suco de maçã da variedade Fuji quanto nas variedades Gala e Sansa.
- O produto fermentado com *Lactobacillus casei* em maçã Gala, conservado a 8°C \pm 0,5, tem viabilidade probiótica de 28 dias.
- Sensorialmente, o suco puro de maçã Gala é caracterizado por cor caramelo, aroma e gosto de maçã.
- Sensorialmente, o fermentado probiótico, antes do período de armazenamento, é caracterizado por textura encorpada e gosto doce.
- Sensorialmente, fermentado probiótico, com tempo de armazenamento de 30 dias a 8°C, é caracterizado por textura encorpada e gosto ácido.
- O produto final do processo de fermentação da maçã Gala, com *Lactobacillus casei*, por 10 horas, com pH inicial 4,0, não necessita de modificações físico-químicas para ser aceito sensorialmente.

O fermentado probiótico com *Lactobacillus casei* em suco de maçã Gala é viável, pode ser armazenado sob refrigeração por 28 dias e tem aceitação sensorial de 96%.

SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Na continuidade das pesquisas, sugere-se a avaliação do efeito do fermentado probiótico de suco de maçã em indivíduos colesterolêmicos; a avaliação do efeito do fermentado probiótico de suco de maçã em indivíduos desnutridos; a avaliação do efeito da bebida fermentada probiótica de suco de maçã em indivíduos ALV positivo; e a avaliação do efeito do fermentado probiótico de suco de maçã em indivíduos lactose-intolerantes; são de relevância para atestar a efetividade do produto e para direcionar a funcionalidade do fermentado probiótico de suco de maçã.

7 REFERÊNCIAS

- 1- Associação Brasileira de Produtores de Maçã (ABPM). **Dados estatísticos sobre a cultura da macieira**. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br>> Acessado: 2 de fevereiro 2004.
- 2- ADOLFO LUTZ, Nomas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 3 ed., v. 1, São Paulo: O Instituto, 1985.
- 3- ANDLAUER, W. e FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. **Food Research International**. v. 35, p. 171-176, 2002.
- 4- AQUARONE, E. et al. **Biotecnologia Industrial – Biotecnologia na Produção de Alimentos**. v. 4. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.
- 5- AQUARONE, E.; LIMA, U. A. e BORZANI, W. **Biotecnologia – Alimentos e bebidas produzidas por fermentação**. v. 5. São Paulo: Edgard Blücher, 1983.
- 6- ARTHEY, D. e ASHURST, P. R. **Fruit processing – nutrition, products, and quality management**. 2 ed. Maryland: AN Aspen publication, 312 p., 2001.
- 7- BRASHEARS, M. M.; GILLILAND, S. E. e BUCK, L. M. Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*. **Journal of Dairy Science**. v. 81, p. 2103-2110, 1998.
- 8- CATS, A. et al. Effect of frequent consumption of a *Lactobacillus casei*-containing milk drink in *Helicobacter pylori*-colonized subjects. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**. v. 17, n. 3, p. 429-435, 2003.
- 9- CAPRA, M. L.; QUIBERONI, A. e REINHEIMER, J. A. Thermal and chemical resistance of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* bacteriophages. **The Society for Applied Microbiology**, v. 38, p. 499-504, 2004.
- 10-CHOI, H. et al. Production of aminopeptidase from skim milk whey. Permeate medium by *Lactobacillus casei* spp. *casei*. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 956-963, 1996.
- 11-DECHARNEUX, T. et al. Effect of various flavonoids on lysosomes subject to an oxidative or an osmotic stress. **Biochemical Pharmacology**, n. 44, v. 7, p. 1243-1248, 1992.
- 12-DELLA TORRE, J. C. de M. et al. Perfil sensorial e aceitação de suco de laranja pasteurizado minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. [online]. maio/ago. 2003, vol.23, no.2, p.105-111. Disponível na World Wide Web:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612003000200001&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0101-2061

- 13-DELNESTE, Y.; HUGHES, A. D. e SCHIFFRIN, E. J. Functional foods: mechanisms of action on immunocompetent cells. **Nutrition Reviews**. v. 56, n. 1, p. S93-S98, 1998.
- 14-DE VUYST, L. E DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 153-177, 1999.
- 15-DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Champagnat, 1996. 23 p.
- 16-FERNÁNDEZ, M. F., BORIS, S. e BARBÉS, C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 449-455, 2003.
- 17-GARCERÁ, M. J. G. et al. Growth and metabolism of L-malic acid by *Lactobacillus plantarum* CECT 220 in a defined medium. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 3, p. 778-780, 1992.
- 18-GARDINER, G. et al. Evaluation of cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 7, p. 1379-1387, 1999.
- 19-GARDINER, G. et al. Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 2192-2199, 1998.
- 20-GILLILAND, S. E. e RICH, C. N. Stability during frozen and subsequent refrigerated storage of *Lactobacillus acidophilus* grown at different pH. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 5, p. 1187-1192, 1990.
- 21-GIRAUD, E. et al. Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 36, p. 379-383, 1991.
- 22-GOMES, A. M. P. e MALCATA F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**. v. 10, p. 139-157, 1999.
- 23-GÖKMEN, V.; ACAR, J. e TAYDAS, E. E.. Presence and formation of lactic acid in apple juices. **Fruit Processing**. Mar/abr, p. 114-117, 2003.
- 24-GOULARTE, V.D.S., ANTUNES, E.C. e ANTUNES, P.L. Qualidade de maçã Fuji osmoticamente concentrada e desidratada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** [online]. maio/ago. 2000, vol.20, no.2, p.160-163. Disponível na World Wide Web:

- <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612000000200006&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0101-2061.
- 25-GUMP, B. H. (editor) e PRUETT, D. J. (editor associado). **Beer and wine production: analysis, characterization, and technological advances**. Washington: American Chemical Society, 275 p., 1993.
 - 26-GUANDALINI, S. et al. *Lactobacillus GG* administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhoea. **Journal Pediatric Gastroenterol Nutrition**, v. 30, p. 54-60, 2000.
 - 27-HAMMES, W. P. e HERTEL, C. Research approaches for pre- and probiotics: challenges and outlook. **Food Research International**. v. 35, p. 165-170, 2002.
 - 28-HERTOG, M.G. et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. **Med Line**, p. 1007-1011, 1993.
 - 29-ITSARANUWAT, P.; AL-HADDAD, K. S. H.; ROBINSON, R. K. The potential therapeutic benefits of consuming 'health-promoting' fermented dairy products: a brief update. **International Journal of Dairy Technology**. v. 56, n. 4, p. 203-210, 2003.
 - 30-JANZANTTI, N. S., FRANCO, M. R. B. e WOSIACKI, G. Efeito do processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** [online]. set./dez. 2003, vol.23, no.3, p.523-528. Disponível na World Wide Web: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612003000300037&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0101-2061.
 - 31-JOHANNINGSMEIER, S. D.; FLEMING, H. P. e BREIDT Jr., F. Malolatic activity of lactic acid bacteria during sauerkraut fermentation. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 8, p. 222-277, 2004.
 - 32-JORGE, A. L. C.; TREPTOW, R. O. e ANTUNES, P. L. **Avaliação físico-química e sensorial de suco de maçãs cultivares Fuji, Granny Smith e seus "blends"**. Revista Brasileira de Agrociência, v. 4, n. 1, p. 15-19, Jan-Abr, 1996. Disponível em: <<http://www.ufpel.tche.br/faem/agrociencia/v4n1/artigo03.pdf>> Acesso em: 21 ago 2004.
 - 33- KNORR, D. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. **Trends in Food Science and Technology**. v. 9, p. 295-306, 1998.
 - 34-KONKEL, F. E. et al. Avaliação sensorial de doce de leite pastoso com diferentes concentrações de amido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. [online]. abr./jun. 2004, vol.24, no.2, p.249-254. Disponível na World Wide Web: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612004000200015&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0101-2061.

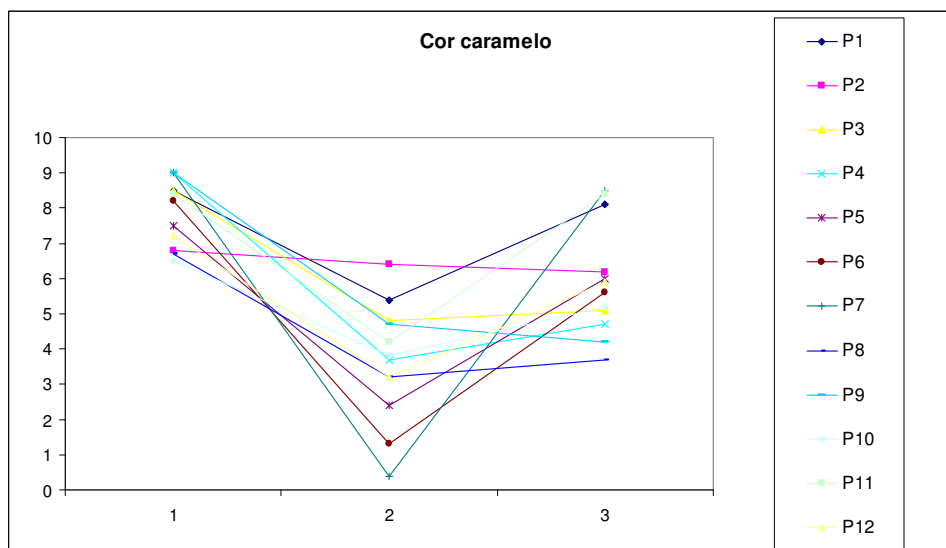
- 35-KOLETZKO, B. et al. Growth, development and differentiation: a functional food science approach. **British Journal of Nutrition**, v. 80, suplemento I, S5-S45, 1998.
- 36-LEA, A. G. e ARNOLD, G. M. The phenolics of ciders: bitterness and adstringency. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 29, p. 478-483, 1978.
- 37-LEE, C. Y. e SMITH, N. L. Apples: an important source of antioxidants in the american diet. **New York Fruit Quartely**, v. 8, n. 2, p. 12-17, 2000.
- 38-LEROY, F. e De VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.
- 39-LIMA, J. R. et al. Caracterização sensorial de amêndoas de castanha-de-cajú fritas e salgadas. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 123-126, 1999.
- 40-LOPEZ, M. C. et al.. Survival of Lactic acid bacteria in commercial frozen yogurt. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 4, p. 706-708, 1998.
- 41-MADRID, A.; CENZANO, I.; VICENTE, J. M. Elaboração de sucos, geléias e bebidas refrigerantes. **Manual de indústrias dos alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1996, 315-370p.
- 42-MARTÍN, R. et al. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. **Trends in Food Science & Technology**. v. 15, p. 121-127, 2004.
- 43-MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V. e CARR, B. T. **Sensory Evaluation Techniques**. 3 ed. Chicago: CRC Press, 1999. 387p.
- 44-MOZZI, F. et al. Effect of galactose and glucose on the exopolysaccharide production and the activities of biosynthetic enzymes in *Lactobacillus casei* CRL 87. **Journal of Applied Microbiology**. v. 91, p. 160-167, 2001.
- 45-NEVES, L. S. **Produção de um derivado de leite de cabra não fermentado com bactérias probióticas**. Londrina, 2000. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Setor de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina.
- 46-NIGHSWONGER, B. D.; BRASHEARS, M. M. e GILLILAND, S. E. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. **Journal of Dairy Science**. v. 79, p. 212-219, 1996.
- 47-NOGUEIRA, A. et al. Efeito do processamento no teor de compostos fenólicos em suco de maçã. **Publicatio UEPG**. n. 3, ano 9, p. 7-14, 2003.

- 48-NOGUEIRA, A. **Tecnologia de processamento sidrícola efeito do oxigênio e do nitrogênio na fermentação lenta da sidra**. Curitiba, 2003. 191 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.
- 49-OLIVEIRA, M. N.; DAMIN, M. R. Effect of total solids and sucrose contents on acidity, firmness and viability of yogurt and probiotic bacteria in fermented milk. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.23 supl., 2003.
- 50-PÉANT, B. e LAPOINTE, G. Identification and characterization of a conserved nuclease secreted by strains of the *Lactobacillus casei* group. **Journal of Applied Microbiology**. v. 96, n. 2, p. 367, 2004.
- 51-PELCZAR Jr., M. J.; CHAN, E. C. S. e KRIEG, N. R. **Microbiologia – conceitos e aplicações**. 2 ed., v. 1. São Paulo: Makron Books, 524p. 1996.
- 52-RICE-EVANS, C. A; MILLER, N. J. e PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology Med**, v. 20, p. 933-956, 1996.
- 53-RIZZON, L. A. e MIELE, A. Acidez na vinificação em tinto das uvas Isabel, Cabernet Sauvignon e Cabernet Franc. **Ciência Rural**. [online]. maio/jun. 2002, vol.32, no.3, p.511-515. Disponível na World Wide Web: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782002000300023&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0103-8478.
- 54-SALMINEN, S. e VON WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria**, New York: Marcel Dekker, 1993. 442 p.
- 55-SALMINEN, S. et al. Demonstration of safety of probiotics – a review. **International Journal of Food Microbiology**. v. 44, p. 93 – 106, 1998.
- 56-SAXELIN, M. et al. The technology of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 387-392, 1999.
- 57-SCHEMIN, M. H. C. **Obtenção de pectina alimentícia a partir de bagaço de maçã**. Curitiba, 2003. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná.
- 58-SHAH, N. P. Functional foods from probiotics and prebiotics. **Food Technology**. v. 55, n. 11, p. 46-53, 2001.
- 59-SHAH, N. P. Symposium - probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**. v. 83, p. 894-907, 2000.
- 60-SHIROSE, I.; MORI, E. E. M. **Estatística aplicada à análise sensorial** (Módulo 1). Manual técnico, 13. Campinas: ITAL, 1994.

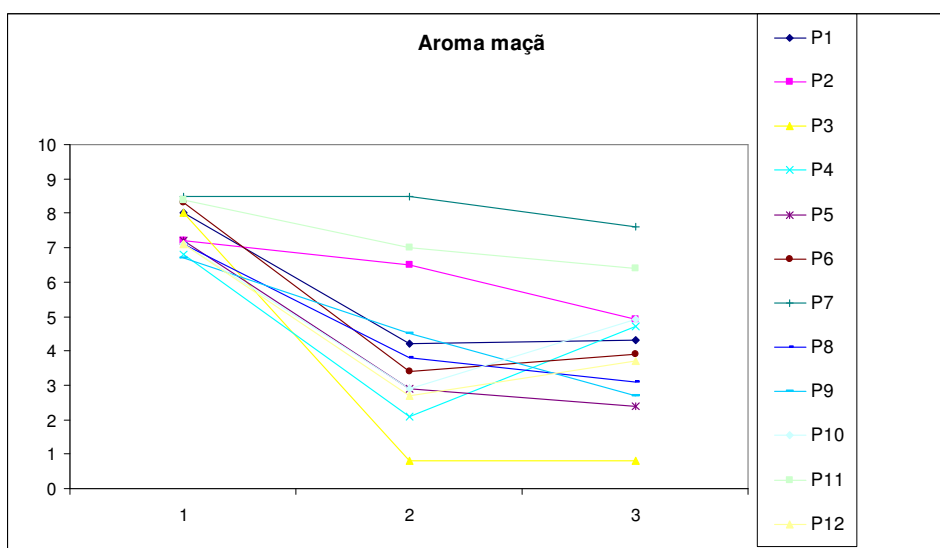
- 61-SHUKLA, F. C., SHARMA, A. e SINGH, B. Studies on the development of beverages using fruit juice/pulp, separated milk and reconstituted skim milk. **International Journal of Dairy Technology**. v. 56, n. 4, p. 243-246, 2003.
- 62-SILVA, N. C. C. **Avaliação do processo de desalcoolização de sidra**. Curitiba, 2004. 107 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.
- 63-SILVA, M. A. A. P. et al. **Curso: análise sensorial descritiva**. 1994. Campinas: Fundação tropical de pesquisas e tecnologia “André Tosello” – Universidade Estadual de Campinas.
- 64-STONE, H. e SIDEL, J. L. **Sensory Evaluation Practices**. 2 ed. San Diego: Academic Press, 1993, 295p.
- 65-TSAO, R. et al. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 51, n. 21, 2003, p. 6347-6353.
- 66-VINDEROLA, C. G. et al. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in argentinian fresco cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1905-1911, 2000.
- 67-VARNAM, A. H. e SUTHERLAND, J. P. **Beverages – technology, chemistry and microbiology**. Maryland: Aspen Publishers, Inc., 464 p., 1999.
- 68-WOSIACKI, G.; PHOLMAN, B. C.; NOGUEIRA, A. Características de qualidade de cultivares de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 347-352, 2004.
- 69-WOSIACKI, G. et al. Estabilidade do suco clarificado de maçã. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 32, n. 4, p. 775-786, 1989.

APÊNDICE

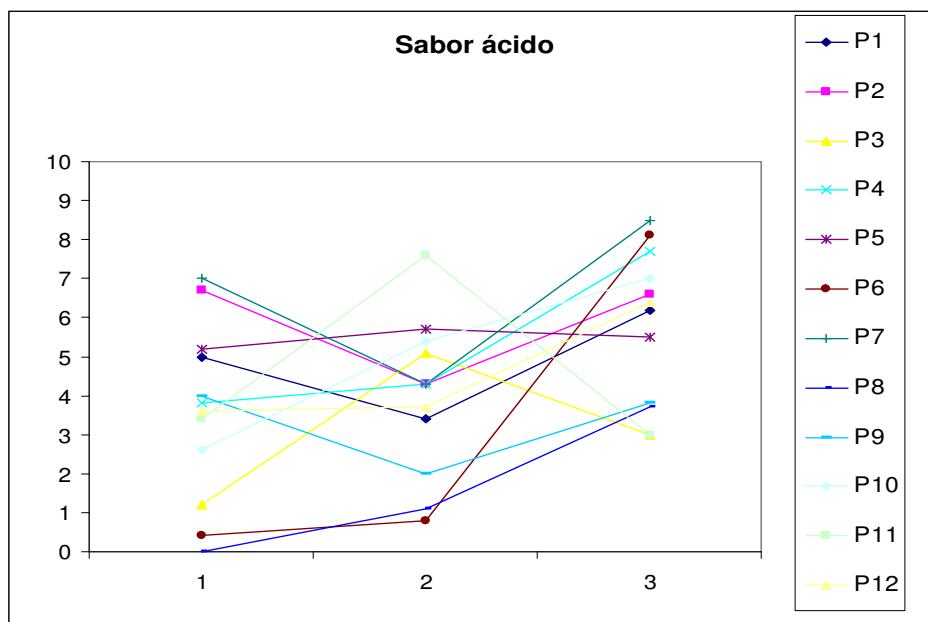
APÊNDICE 1– TENDÊNCIA DA AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS PROVADORES PARA AS AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ EM RELAÇÃO AO ATRIBUTO COR CARAMELO



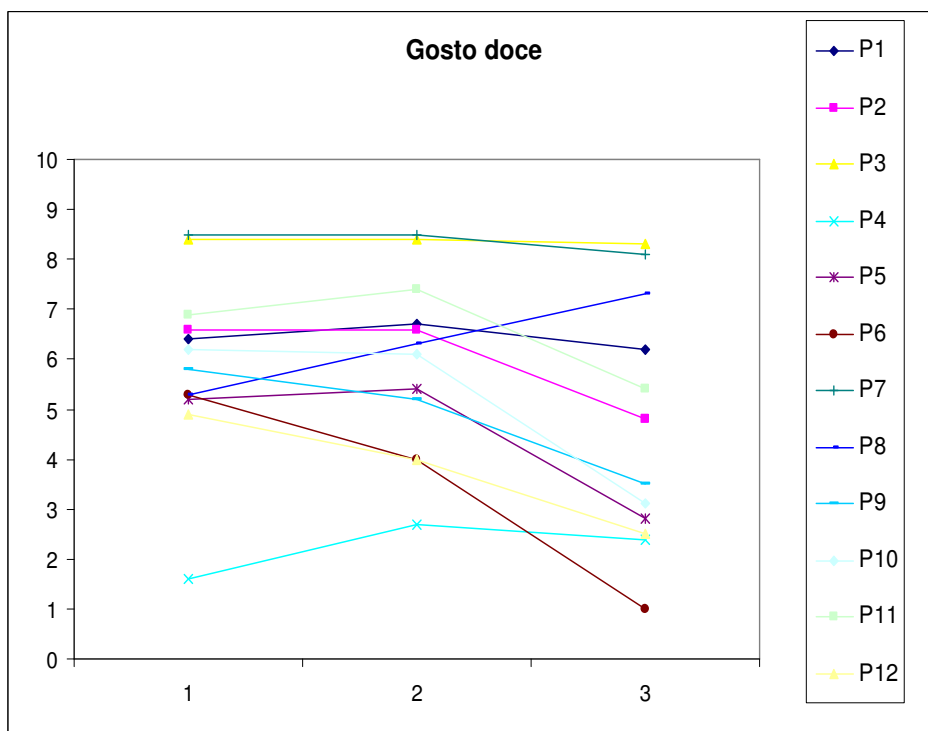
APÊNDICE 2 – TENDÊNCIA DA AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS PROVADORES PARA AS AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ EM RELAÇÃO AO ATRIBUTO AROMA DE MAÇÃ



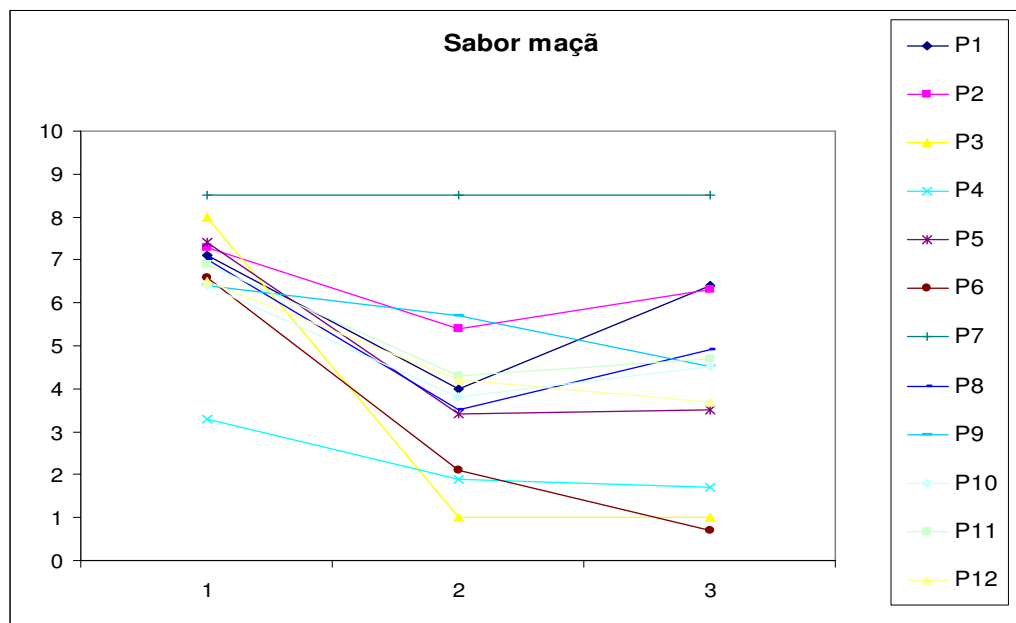
APÊNDICE 3 – TENDÊNCIA DA AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS PROVADORES PARA AS AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ EM RELAÇÃO AO ATRIBUTO SABOR ÁCIDO



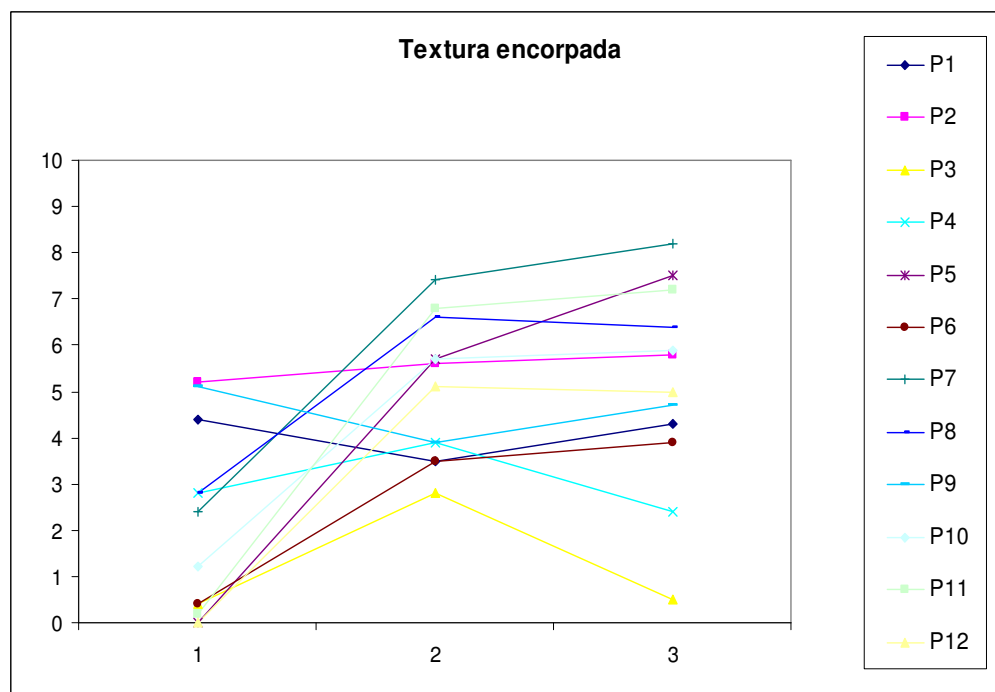
APÊNDICE 4 – TENDÊNCIA DA AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS PROVADORES PARA AS AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ EM RELAÇÃO AO ATRIBUTO GOSTO DOCE



APÊNDICE 5 – TENDÊNCIA DA AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS PROVADORES PARA AS AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ EM RELAÇÃO AO ATRIBUTO SABOR MAÇÃ



APÊNDICE 6 – TENDÊNCIA DA AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS PROVADORES PARA AS AMOSTRAS DE SUCO DE MAÇÃ EM RELAÇÃO AO ATRIBUTO TEXTURA ENCORPADA



APÊNDICE 7 – CÁLCULOS DA ANÁLISE SENSORIAL DE ACEITAÇÃO PELO TESTE DE GOODMAN

Dado que neste experimento:

t = número de formulações = 3;

k = número de graus de apreciação = 5;

n.. = número total de provadores = 177.

$$p.j = n.. \left(\sum_{i=1}^t \frac{ni.^2}{nij} \right)^{-1} \quad [\text{eq. 1}]$$

$$p.1 = n.. \left(\sum_{i=1}^3 \frac{ni.^2}{nij} \right)^{-1} = 177 \left(\frac{(61)^2}{44} + \frac{(57)^2}{30} + \frac{(59)^2}{40} \right)^{-1} = 0,63214$$

$$p.2 = n.. \left(\sum_{i=1}^3 \frac{ni.^2}{nij} \right)^{-1} = 177 \left(\frac{(61)^2}{11} + \frac{(57)^2}{21} + \frac{(59)^2}{17} \right)^{-1} = 0,253$$

$$p.3 = n.. \left(\sum_{i=1}^3 \frac{ni.^2}{nij} \right)^{-1} = 177 \left(\frac{(61)^2}{2} + \frac{(57)^2}{2} + \frac{(59)^2}{1} \right)^{-1} = 0,0254$$

$$p.4 = n.. \left(\sum_{i=1}^3 \frac{ni.^2}{nij} \right)^{-1} = 177 \left(\frac{(61)^2}{1} + \frac{(57)^2}{3} + \frac{(59)^2}{1} \right)^{-1} = 0,0213$$

$$p.5 = n.. \left(\sum_{i=1}^3 \frac{ni.^2}{nij} \right)^{-1} = 177 \left(\frac{(61)^2}{3} + \frac{(57)^2}{1} + \frac{(59)^2}{0} \right)^{-1} = 0,0394$$

$$p_j = 0,97122$$

$$Y^2 = n.. \left[\left(\sum_{j=1}^k p.j \right)^{-1} - 1 \right] \quad [\text{eq. 2}]$$

$$Y^2 = 177 (0,97122)^{-1} - 1 = 5,24$$

$$gl = (t-1) (k-1) = (3-1) (5-1) = 8 \quad [\text{eq. 5}]$$

$$\chi^2 = 7,34.$$